

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 30 日 (30.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/058339 A1(51) 国際特許分類:  
A61K 35/78, A23L  
1/30, 2/38, 2/52, A61P 7/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017780

(22) 国際出願日: 2004 年 11 月 30 日 (30.11.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2003-405436 2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003) JP

特願2003-405449 2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003) JP

特願2003-405452 2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003) JP

特願 2003-421762

2003 年 12 月 19 日 (19.12.2003) JP

特願 2003-421765

2003 年 12 月 19 日 (19.12.2003) JP

特願 2003-421803

2003 年 12 月 19 日 (19.12.2003) JP

特願2004-183472 2004 年 6 月 22 日 (22.06.2004) JP

特願2004-273336 2004 年 9 月 21 日 (21.09.2004) JP

特願2004-273361 2004 年 9 月 21 日 (21.09.2004) JP

特願 2004-328521

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

特願 2004-328522

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

特願 2004-328526

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

特願 2004-328529

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

特願 2004-328531

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

特願 2004-328534

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

特願 2004-328536

2004 年 11 月 12 日 (12.11.2004) JP

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 坂口 騰 (SAK-  
AGUCHI, Noboru). 杉野 豪俊 (SUGINO, Hidetoshi).  
大久保 勉 (OKUBO, Tsutomu). 伊藤 俊宏 (ITO,  
Toshihiro). 紀平 智彦 (KIHIRA, Tomohiko). 尹 先  
柱 (YOON, Seon-Joo). ラオ テータム プラジウムナ  
(RAO, Theertham Pradyumna). ララ ティ (HLAHLA,  
Htay). ジュネジャ レカラジュ (JUNEJA, Lekh Raj).(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒5406591  
大阪府大阪市中央区大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM  
ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka  
(JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受  
領の際には再公開される。(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 太陽化  
学株式会社 (TAIYO KAGAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒  
5100825 三重県四日市市赤堀新町 9 番 5 号 Mie (JP).2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION FOR INHIBITING THROMBOSIS

(54) 発明の名称: 血栓形成抑制用組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a composition for inhibiting thrombosis usable in foods, drinks, quasi drugs, drugs and feeds  
which contains definite vegetable components originating in amla, tea, hibiscus, *Xanthium strumarium*, gymnema, *Hijikia fusiforme*  
and carrageenan.(57) 要約: 本発明は、飲食品、医薬部外品、医薬品、飼料に使用可能な、アムラー、茶、ハイビスカス、オナモ  
ミ、ギムネマ、ヒジキ、及びカラギナン由来の所定の植物成分を含有してなる血栓形成抑制用組成物を提供する。

WO 2005/058339 A1

## 明 細 書

### 血栓形成抑制用組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、血栓形成抑制用組成物に関する。

### 背景技術

[0002] 血栓とは血管の中にできる血の塊のことであり、フィブリノーゲンというタンパク質が活性化され、フィブリンに転換されながら、血小板、白血球等と共に、不溶性の重合体となって血管の内壁に固まってできる。身体が正常なときには、この血栓のもととなるフィブリンを溶かす働きをする線溶酵素が血栓予防をするが、線溶酵素が不足するとフィブリンを溶解できなくなり、血栓ができるようになる。血栓には一次止血（血小板凝集）と二次止血（血液凝固）がある。血管の破綻により出血が生じ血小板が血管壁にあいた穴に粘着・凝集してとりあえずの止血をする。これを一次止血といい、できた血栓を一次血栓という。さらに血漿中の水溶性の凝固因子（フィブリノーゲン）が非水溶性（フィブリン）となり、血小板の間に糸状に網を張り、一次血栓を強化する。これを二次止血といい、できた血栓を二次血栓という。

[0003] 血小板凝集は、血管壁の破綻により壁にあるコラーゲンが露出し、露出したコラーゲンに血小板が粘着し、さらに血小板同士が凝集して生ずる。血液凝固の機序には内因系凝固と外因系凝固がある。内因系凝固は、第XII因子が陰性荷電を持つ内皮下組織に接触し、第XII因子が活性化され、次に第XI因子が活性化第XII因子に活性化され、次々に内因系の凝固因子が活性化され、最終的に第I因子であるフィブリノーゲンが第II因子（プロトロビン）の活性型であるトロンビンにより限定分解を受け、フィブリンとなり血栓が形成される。外因系凝固は、組織因子と第VII因子により、活性化され、第X因子の活性化からは内因系と共通性凝固機構に移行し、最終的に第I因子であるフィブリノーゲンが第II因子（プロトロビン）の活性型であるトロンビンにより限定分解を受け、フィブリンとなり血栓が形成される。

[0004] 形成された血栓は血管に沈着し、血管の断面積を減少させ、血液の循環を阻害し、その結果、血液が細胞及び組織で栄養分と酸素を正常に供給することができず、

また、細胞及び組織の老廃物を排出できなくなり、毒性が蓄積される等の問題点が発生するようになる。

[0005] 血管の中で、血栓が引き起こす症状を広義の血栓症(以下、単に「血栓症」と記載した場合は、広義の血栓症をいう)と呼び、血栓が原因になって起こる病態は狭義の血栓症と塞栓症に分けられる。狭義の血栓症は血栓が形成個所で血流を部分的にあるいは完全に閉塞することによる症状で、塞栓症は血栓が形成個所から剥がれて血流によって移動し、他の個所で血流を部分的にあるいは完全に閉塞することによって起こる病態のことを指す。

[0006] このような血栓症は血栓が生じた血管の部位によって多様な疾病を誘発するようになる。その中でも特に脳血管や心臓血管に生じた場合には脳卒中、脳出血、脳梗塞、心不全症、心筋梗塞、心臓麻痺等、深刻な症状が発生し、半身不随を引き起こし、ひどい場合には死亡することもある。

[0007] これらの心疾患、脳血管疾患等を引き起こす重大な血栓は血流のうっ滞下で形成されるフィブリン血栓とは機序の点で異なり、動脈等の比較的速く豊富な血流の存在下で形成されていると考えられる。血流下では、凝固因子は活性化されても血流によって希釈されてしまうため効率的に血栓形成に至らない。しかし、損傷血管壁に粘着し、凝集して局所濃度を高める成分である血小板が血栓の形成により重要な役割を果たす。

[0008] 血管内皮細胞が障害を受け剥離すると、血管内皮細胞下組織のコラーゲンが露出し、血管内皮細胞で合成されるvon-willebrand因子(vWF:VII因子)により、コラーゲンとvWF受容体(GpIb)の間に架橋が形成(粘着)される。さらに、血小板が例えばトロンビンのようなアゴニストによって活性化され、フィブリノーゲン受容体(GpIIb-IIIa)によりフィブリノーゲンを介して他の血小板と結合し、血小板凝集を引き起こし、血小板血栓が形成される。従って、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成、又はフィブリノーゲンを介する他の血小板とのGpIIb-IIIaによる結合を抑制できるかどうかは血栓形成を予防する一つの重要な要件となる。

[0009] なお、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を促進するアゴニストとしてはリストセチンが、GpIIb-IIIaによるフィブリノーゲンを介した他の血小板との結合を促進

するアゴニストとしては、コラーゲン及びトロンビンのような様々な物質によって、血管系の血小板及び損傷した血液細胞、内皮又は組織から放出されるアデノシン二リン酸(ADENOSINE 5'DIPHOSPHATE SODIUM:ADP)が知られている。

[0010] 血栓症の治療には、血栓の生成を抑制する抗血栓剤及び血栓形成予防剤と、生成された血栓を溶解させる血栓溶解剤の研究開発が主に行われている。

[0011] 抗血栓剤には抗血小板剤と抗凝固剤がある。抗血小板剤は、血栓形成の初期の段階に参与する血小板の機能を抑制することを目的としており、アスピリン等多くの経口投与可能な薬剤が開発されているが、これらは現在、脳梗塞、心筋梗塞症等の再発予防、及び各種バイパス手術後の閉塞予防等に用いられており、血栓症の治療剤というよりも、血栓形成予防薬として使用されている。抗凝固剤にはアンチトロンビンIIIによるトロンビンの阻害を促進することにより作用するヘパリンと経口抗凝固薬のクマリン誘導体のワルファリン等が臨床で使われている。ワルファリンは、プロトロンビン合成においてトランスレーション後のビタミンK依存性γ-カルボキシル化を阻害することによりトロンビンの発生を阻止する。しかし、ヘパリンは非経口的に投与しなければならず、これはアンチトロンビンIIIのコファクターとして機能するので、この阻害剤なしでは効果はない。ワルファリンは非常にゆっくりと効果を発現し、個々の投与量は頻繁に試練して調整しなければならない。これらの抗凝固剤でトロンビンのみに特異的なものはなく、これらはその他のセリン-プロテアーゼをも阻害し、両者共に投与量を正しく調整しなければ出血を誘起する可能性がある。また最近ではエイコサペンタエン酸(EPA)、プロスタサイクリン(Prostacycline;PGI<sub>2</sub>)誘導体等が商品化されている。しかし、これらの薬剤は特異性がないため、生体内においては血栓以外の部分にも影響を及ぼし、生体内に残存した場合、出血等を引き起こす可能性がある。その他に、ヒルジン(hirudin)、合成抗トロンビン(synthetic antithrombin)、チクロピジン(Ticlopidin)等の抗血栓活性も報告されているが、まだ実用化には至っていない。

[0012] 血栓溶解剤としては、ストレプトキナーゼ(streptokinase)、ウロキナーゼ(urokinase)のようなプラスミノゲンアクチベーター(plasminogen activator)が知られており、プラスミノゲンアクチベーターを血栓が生成された患者に静脈注射して、体内の血

栓溶解系を活性化する方法が一般的に使われている。その血栓溶解効果は、幾多の臨床実験で立証されたが、抗血栓剤又は血栓形成予防剤と同様、血栓に対する特異性が無く、血栓を治療する間に全身出血する等の副作用がある。また組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, tPA) は血栓に対する選択性が高く、理想的な血栓溶解剤と考えられたが、実際に臨床治療に適用した結果、程度の差はあるが相変わらず全身出血等の副作用があった。また血液内での半減期が非常に短く、薬効の持続時間が短いため、体内で薬効を維持するためには投与量が多くなければならず、そのため治療費用が従来の血栓溶解剤に比べ非常に高いという問題点がある。

- [0013] このような医薬品が血栓の生成予防に使用されてはいるものの、血栓除去にあまり著しい効果を現わすことが無く、深刻な副作用を誘発するため、最近では、医薬品による治療よりは食生活を通じて病気を予防し、体質を調節又は活性化させる機能を持った成分又は食品成分に対する研究も注目されるようになってきている。
- [0014] 食品成分としては、多価不飽和脂肪酸、グルコサミン、タマネギの薄皮 (例えば、特許文献1参照。) 等の素材が知られているが、風味や性状等に問題があり、幅広く食品に応用できなかった。
- [0015] また、最近では、キウイフルーツ抽出物 (例えば、特許文献2参照。) についての特許が公開されたが、中性域での活性が弱いという欠点がある。
- [0016] さらに、ナットウキナーゼ (例えば、特許文献3参照。) が良く知られているが、ナットウキナーゼは血栓溶解効果を有するものの同時に凝固因子の産生に寄与するビタミンKを含んでいる。

特許文献1: 特開2002-171934号公報 (第2頁)

特許文献2: 特開2003-171294号公報 (第2-5頁)

特許文献3: 特開2004-65047号公報 (第3頁)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0017] 本発明の課題は、飲食品、医薬部外品、医薬品、飼料に使用可能な、所定の植物成分を含有してなる血栓形成抑制用組成物を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

- [0018] 本発明者らは様々な天然植物を利用して血栓形成抑制成分を捜す目的で、多角的に研究検討した結果、アムラー、茶、ハイビスカス、オナモミ、ギムネマ、ヒジキ、及びカラギナン由来の所定の植物成分に優れた血栓形成抑制作用があることを見出し、本発明を完成させた。
- [0019] すなわち、本発明の要旨は、
- [1] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする抗血栓組成物、
  - [2] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とするフィブリン形成阻害組成物、
  - [3] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする抗血小板凝集組成物、
  - [4] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集抑制組成物、
  - [5] 茶の抽出物を含有することを特徴とする抗血栓用組成物、
  - [6] 茶の抽出物を含有することを特徴とする抗血小板凝集用組成物、
  - [7] ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする抗血液凝固組成物、
  - [8] ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集予防組成物、
  - [9] ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集予防用組成物、
  - [10] オナモミの果実、果汁、種子及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集血栓抑制組成物、
  - [11] オナモミの果実、果汁、種子及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集血栓抑制用組成物、
  - [12] ギムネマ、その抽出物又はそれらの混合物を含有することを特徴とする血栓形成抑制剤、

〔13〕 ヒジキ、その抽出物又はそれらの混合物を含有することを特徴とする外因系凝固予防組成物、

〔14〕 ヒジキ、その抽出物又はそれらの混合物を含有することを特徴とする血栓予防組成物、

〔15〕 ヒジキ、その抽出物又はそれらの混合物の酵素処理物を含有することを特徴とする血栓予防用組成物、並びに

〔16〕 カラギナンを含有することを特徴とする抗血栓剤、  
に関する。

### 発明の効果

[0020] 本発明により、血栓形成抑制作用を有する上記所定の植物成分を含む血栓形成抑制用組成物が提供される。該成分は、従来人間が日常の食生活において使用してきた天然植物由来であるため、該組成物によれば、従来の薬剤とは異なり、体内で出血を生ずる副作用がなく安全に血栓形成を抑制して、脳出血、脳梗塞、心筋梗塞、動脈硬化及び冠状動脈症のような心血管系疾患を予防することができる。本発明の血栓形成抑制用組成物は、例えば、飲食品、医薬部外品、医薬品、飼料に応用することができる。

### 発明を実施するための最良の形態

[0021] 本発明は総じて血栓形成抑制用組成物を提供するものであるが、詳しくは、有効成分として使用される植物成分により種々の組成物が提供される。なお、本発明の組成物は有効成分そのものであってもよい。以下、使用植物ごとに分けて説明する。本発明の組成物の原料等は任意に単独で若しくは2種以上を混合して用いることができる。

[0022] なお、本明細書において、抗血小板凝集、血小板凝集抑制、血小板凝集予防、及び抗血小板の語は同意義を有する。

[0023] (1) アムラー

本発明において具体的には、アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを有効成分として含有することを特徴とする、抗血栓組成物、フィブリン形成阻害組成物、抗血小板凝集組成物、及び血小板凝集抑制組成

物が提供される。

- [0024] 本発明の組成物は前記アムラー成分が有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、かかるアムラー成分について以下の作用を初めて見出した。
- [0025] すなわち、前記アムラー成分について、活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time; APTT) を測定した結果から、内因性経路に関与する因子を不活性化して、フィブリン形成を阻害し、血管内の血栓生成を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0026] 前記アムラー成分について、フィブリン形成阻害試験の結果から、血栓形成の最終段階でトロンビンによるフィブリノーゲンからのフィブリン形成を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0027] 前記アムラー成分について、血小板凝集試験の結果から、血小板凝集物の生成を抑制する効果が高いことがわかった。すなわち、前記アムラー成分について、GpIIb-IIIaによりフィブリノーゲンを介して他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集、いわゆるADP惹起血小板凝集の試験結果から、GpIIb-IIIaによるフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を抑制することによって血小板凝集を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0028] 前記アムラー成分について、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成による血小板凝集をおこすアゴニストであるリストセチンを加えた時の血小板凝集、いわゆるリストセチン惹起血小板凝集の試験結果から、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0029] 本発明に用いるアムラーとは、学名：エンブリカ・オフィシナル (Emblica officinalis) 又は、フィランサス・エンブリカ (Phyllanthus embilica) といい、トウダイグサ科コミカンソウ属に属する落葉の亜高木であり、インドからマレーシア地域及び中国南部にかけて分布しており、インドが原産地と考えられている。また、各地方又は言語により、各々固有の名称があり、余柑子、油甘、奄摩勒、エンブリック・ミロ balan、アーマラキー、マラッカノキ、マラッカツリー、インディアングーズベリー、アロンラ、アミラ、アミラキ、アミラキヤトラ、ネリカイ、ネルリ、タシャ、カユラカ、ケムラカ、ナックホンポン等と



も称されている。

- [0030] 本発明において、アムラーの部位としては、果実が好ましく用いられる。その形態は、特に限定するものではなく、未熟果実、完熟果実、乾燥果実等の全部又は一部のいずれでもよい。また、果実を絞って得られる果汁も有効成分として用いられる。果汁は果汁粉末等として用いても良い。
- [0031] 果汁又は果汁粉末の場合は、そのままで使用できるが、生果実又は乾燥果実等、水不溶性成分を含むものを使用する場合は、抽出により、水不溶性成分が除去されていることが効果を上げる点で好ましい。
- [0032] 抽出の際、生果実を使用する場合は、種子を除去した後、水を添加又は無添加で、抽出効率を高めるためにミキサー等により破碎、均質化したものを抽出原料として用いることが好ましい。
- [0033] 乾燥果実を使用する場合は、抽出効率を高めるために40メッシュ以下の粒度になるように粉碎されたものを抽出原料として用いることが好ましい。
- [0034] また、果汁も抽出原料として使用される。
- [0035] 本発明の抗血栓組成物における抽出物は、以下のようにして調製するのが好ましい。
- [0036] 抽出方法は、抽出溶媒、抽出温度等、特に限定されるものではない。抽出溶媒としては、水、塩基、酸、その他食塩水等の非有機溶媒を使うことができる。好ましくは、水、塩基、及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1つである。
- [0037] 酸又は塩基を抽出溶媒で使う場合、抽出物を中和させることが好ましい。中和反応によって生成された塩は、透析法やゲル濾過等、公知の方法により、取り除くことができる。水を抽出溶媒として用いた場合には、上記のような中和反応は必要なく、生成された塩を取り除く必要もないため、水を用いることが更に好ましい。
- [0038] この時使用する酸としては、特に限定するものではなく、大部分の酸を使うことができるが、好ましくは、塩酸及び硫酸より選ばれる1種又は両者の併用である。
- [0039] また、塩基としては、特に限定するものではなく、大部分の塩基を使うことができるが、好ましくは、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムより選ばれる1種又は両者の併用である。

- [0040] 抽出に使用される酸又は塩基の濃度は、特に限定するものではなく、酸又は塩基の強さによって変化するが、0.01～0.5モルの濃度が好ましい。通常、酸又は塩基は、かかる濃度の水溶液として使用される。
- [0041] 抽出溶媒は、乾燥した抽出原料100重量部に対して、好ましくは500～5000重量部使用すればよい。抽出温度としては、40～70℃が好適である。抽出は静置して又は攪拌下に行えばよい。
- [0042] なお、本明細書における乾燥操作は、乾燥対象を乾燥機〔例えば、送風定温乾燥機（ヤマト社製）〕内で60～110℃で2～16時間維持することにより行うことができる。例えば、乾燥対象を70℃で10時間維持して乾燥を行う。
- [0043] 上記の抽出において、抽出残渣に対して再度抽出工程を1回又はそれ以上繰り返すことで、抽出率が向上し、収率が向上するので、好ましい。この場合の抽出に用いる溶媒は、同じでも良いし、別の溶媒を用いても良い。
- [0044] 果汁、又は上記のようにして得られた抽出液（抽出物含有液、以下同様）は、そのままでも使用できるが、濾過や遠心分離により不溶性物質を取り除くことにより、相対的に抗血栓作用が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。
- [0045] 不溶性物質を取り除いた後、果汁又は抽出液をそのまま又は濃縮した後にエタノールを加えて得られる沈殿物を回収したものは、更に抗血栓作用が高くなるので好ましい。エタノールの濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び作用向上の点より、エタノール濃度として60～95%（v/v）が好ましく、70～90%（v/v）がより好ましい。なお、本明細書において「沈殿物」とは、沈殿物を含む液を、例えば、25℃において2000rpm以上で遠心分離した場合に沈殿する物質をいう。
- [0046] 抽出液はそのままでの使用も可能だが、所望により噴霧乾燥や凍結乾燥等の手段により乾燥粉末化させて使用することも可能である。
- [0047] 本発明の抗血栓組成物中のアムラーの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10～100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20～90重量%であり、アムラーの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5～100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10～95重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1～100重量%、

該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。

- [0048] 本発明の抗血栓組成物としては、アムラーの果実又は果汁の抽出物が、アムラーの果実又は果汁から水、塩基、及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを用いて抽出されたものである抗血栓組成物、及びアムラーの果実若しくは果汁の抽出物、又は果汁からエタノールにより分画された沈殿物を含有する抗血栓組成物が好適である。
- [0049] 本発明のフィブリン形成阻害組成物における抽出物は、以下のようにして調製するのが好ましい。なお、以下に記載する以外の点については前記抗血栓組成物の場合と同様である。
- [0050] 抽出溶媒としては、水、塩基、酸、その他親水性溶媒を使うことができる。親水性溶媒はメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールなどの低級アルコール及びアセトンが操作性、抽出効率の点から好ましい。特に好ましくは、水、塩基、及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1つである。
- [0051] 果汁、又は抽出液は、そのままで使用できるが、濾過や遠心分離により、不溶性物質を取り除くことにより、相対的にフィブリン形成阻害作用が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。
- [0052] 不溶性物質を取り除いた後、果汁又は抽出液をそのまま又は濃縮した後にエタノールを加えて得られる沈殿物を回収したものは、更にフィブリン形成阻害作用が高くなるので好ましい。エタノールの濃度としては、特に限定するものではないが、作用向上の点より、20〜80% (v/v) が好ましく、60〜80% (v/v) がより好ましい。
- [0053] さらにエタノールを加えて得られた沈殿物をクロマトグラフィーやカラムを用いて精製したものは更にフィブリン形成阻害作用が高い画分として得られるので好ましい。クロマトグラフィーやカラムは、特に限定するものではないが、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、吸着カラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、疎水性カラム、逆相カラムが使用できる。精製効率の点からゲル濾過クロマトグラフィー、又はゲル濾過カラムが望ましい。

- [0054] 本発明のフィブリン形成阻害組成物中のアムラーの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、アムラーの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10〜95重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。
- [0055] 本発明のフィブリン形成阻害組成物としては、アムラーの果実又は果汁の抽出物が、アムラーの果実又は果汁から水、塩基、酸、及び親水性溶媒からなる群より選ばれた少なくとも1つを用いて抽出されたものであるフィブリン形成阻害組成物、及びアムラーの果実若しくは果汁の抽出物、又は果汁からエタノールにより分画された沈殿物を含有するフィブリン形成阻害組成物が好適である。
- [0056] 本発明の抗血小板凝集組成物における抽出物は、以下のようにして調製するのが好ましい。なお、以下に記載する以外の点については前記抗血栓組成物の場合と同様である。
- [0057] 果汁、又は抽出液は、そのままでも使用できるが、濾過や遠心分離により、不溶性物質を取り除くことにより、相対的に抗血小板作用が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。
- [0058] 不溶性物質を取り除いた後、果汁又は抽出液をそのまま又は濃縮した後にエタノールを加えて得られる上澄み(可溶性画分を含む)を回収したものは、更に抗血小板作用が高くなるので好ましい。エタノールの濃度としては、特に限定するものではないが、作用向上の点より、10〜90% (v/v) が好ましく、10〜30% (v/v) が更に好ましい。なお、本明細書において上澄みとは、沈殿物を含む液を、例えば、25℃において2000rpm以上で遠心分離した場合に沈殿する物質を除いた残液をいう。
- [0059] 本発明の抗血小板凝集組成物中のアムラーの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、アムラーの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10〜95

重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。

[0060] 本発明の抗血小板凝集組成物としては、アムラーの果実又は果汁の抽出物が、アムラーの果実又は果汁から水、塩基、及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを用いて抽出されたものである抗血小板凝集組成物、及びアムラーの果実若しくは果汁の抽出物、又は果汁からエタノールにより分画された可溶性画分を含有する抗血小板凝集組成物が好適である。

[0061] 本発明の血小板凝集抑制組成物における抽出物は、以下のようにして調製するのが好ましい。なお、以下に記載する以外の点については前記抗血栓組成物の場合と同様である。

[0062] 抽出溶媒としては、水、塩基、酸等の他、親水性溶媒、アセトンを使うことができる。親水性溶媒はメチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコール群より選ばれる1種類以上が操作性、抽出効率の点から好ましい。特に好ましくは、水、塩基、及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1つである。

[0063] 果汁、又は抽出液は、そのままでも使用できるが、濾過、遠心分離及び分留により、不溶性物質及び溶媒を取り除くことにより、抗血小板作用が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。

[0064] 不溶性物質及び溶媒を取り除いた後、果汁又は抽出液をそのまま又は濃縮した後に有機溶媒を用いて分配を行い、それぞれの溶媒可溶画分を得てもよい。これら溶媒可溶画分は、更に抗血小板作用が高くなるので好ましい。有機溶媒としてはメチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコールや酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、アセトン又はクロロホルムが使用できる。また可溶画分の純度を上げる為には、他の疎水性溶媒による分配を組み合わせることもできるが、エチルアルコールの使用が好ましい。これら溶媒の濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び作用向上の点より、終濃度として20

ー80% (v/v) が好ましく、20ー60% (v/v) がより好ましい。

- [0065] さらに純度を高める為に、フェノール系、スチレン系、アクリル酸系、エポキシアミン系、ピリジン系、メタクリル系などを母体とした疎水性樹脂を用いたクロマトグラフィーやカラムによる精製を行ってもよい。その場合、樹脂吸着後の溶離液としては、メチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールなどの低級アルコール及びアセトンを単独で又は水溶液として使用できる。
- [0066] 本発明の血小板凝集抑制組成物中のアムラーの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10ー100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20ー90重量%であり、アムラーの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5ー100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10ー95重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1ー100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5ー95重量%である。
- [0067] 本発明の血小板凝集抑制組成物としては、アムラーの果実又は果汁の抽出物が、アムラーの果実又は果汁から水、塩基、酸、親水性溶媒、及びアセトンからなる群より選ばれる少なくとも1つを用いて抽出されたものである血小板凝集抑制組成物、アムラーの果実又は果汁の抽出物の有機溶媒、好ましくはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、又はクロロホルムからなる群より選ばれる少なくとも1種による分画物を含有する血小板凝集抑制組成物が好適である。
- [0068] なお、以上の本発明の各組成物に使用する抽出物の抽出操作において、併せて酵素処理することによって収率や風味の改善ができ、また作用の高いものが得られるので、抽出原料の抽出前及び／又は抽出時に酵素処理をすることが好ましい。酵素処理する時のpHは使用する酵素の至適pH及びpH安定性を指標に適宜選択できる。また、処理するときの温度に関しても使用する酵素の至適温度及び温度安定性を指標に適宜選択できる。本発明の酵素処理に使用する酵素は限定するものではない。

いが、食品工業用に用いるものであれば、特に限定するものではなく、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、トランスグルコシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、グルタミナーゼ、ヌクレアーゼ、デアミナーゼ、デキストラナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ラクターゼ、タンナーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、プルラナーゼ、トリプシン、パパイン、レンネット、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>等より選ばれる1種類又は2種類以上が挙げられる。好ましくは、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、及びタンナーゼより選ばれる1種類又は2種類以上を併用することができる。酵素の使用量は特に限定するものではないが、酵素の種類によっても異なるが、乾燥した抽出原料100重量部に対して0.05〜2重量部使用することが好ましい。なお、酵素処理は同様にしてアムラーの果実又は果汁に対して行ってもよい。

[0069] 従って、以上の本発明の組成物としては、酵素処理してなる、アムラーの果実、果汁又はそれらの抽出物を含有する組成物がより好適である。

[0070] 本発明の抗血栓組成物における抗血栓とは、特に限定されるものではないが、好ましくは、血栓の生成を抑制する作用(抗凝固作用)のことである。抗血栓効果は、例えば、後述の試験例A-1に示すように、内因性血液凝固システムに対する、抗凝固活性を測定する方法である、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定することにより確認することができる。

[0071] 本発明のフィブリン形成阻害組成物におけるフィブリン形成阻害効果は、例えば、後述の試験例A'-1に示すように、0.7%フィブリンノーゲン試液3ミリリットルにフィブリン形成阻害組成物300マイクロリットルを加え均一させた後、トロンビン試液(10U/ml)300マイクロリットルを添加して、フィブリン形成凝固させて、その凝固重量を測定し、フィブリン形成阻害率を調べることによって確認することができる。フィブリン形成阻害率としては、通常、20%以上が好ましく、30%以上がより好ましい。

[0072] 本発明の抗血小板凝集組成物における抗血小板凝集とは、血小板の凝集を抑制することをいい、単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例A''-1に示すように、血小板凝集測定機(Aggregometer)を使用して、血小板の浮遊液(Platelet rich plasma)又は採取血液に、凝集を惹起さ

せる物質(ADP、エピネフリン、コラーゲン、アラキドン酸等)を加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0073] 本発明の血小板凝集抑制組成物における血小板凝集抑制とは、血小板の凝集を抑制することをいい、単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例A'''-1に示すように、全血血小板凝集測定装置(Aggregometer)を使用して、採取血液に、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成による血小板凝集をおこすアゴニストであるリストセチンを加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0074] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に接触できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。

[0075] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。

[0076] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05〜20g/日、好ましくは0.1〜5g/日である。

[0077] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。

[0078] 本発明の組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約40mg〜3g/日、好ましくは100〜500mg/日である。

[0079] (2) 茶

本発明において具体的には、茶の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする、抗血栓用組成物、及び抗血小板凝集用組成物が提供される。

[0080] 本発明の組成物は前記茶成分が有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、かかる茶成分について以下の作用を初めて見出した。



- [0081] すなわち、前記茶成分について、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した結果から、内因性経路に關与する因子を不活性化して、フィブリン形成を阻害し、血管内の血栓生成を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0082] 前記茶成分について、血小板凝集試験の結果から、血小板凝集物の生成を抑制する効果が高いことがわかった。すなわち、前記茶成分について、GpIIb-IIIaによりフィブリノーゲンを介して他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集、いわゆるADP惹起血小板凝集の試験結果から、GpIIb-IIIaによるフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を抑制することによって血小板凝集を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0083] 本発明に用いる茶とは、特に限定するものではなく、植物学的にはツバキ科植物の葉より製造される不発酵茶である緑茶、半発酵茶である烏龍茶、発酵茶である紅茶が挙げられる。それらの中で、効果の点より好ましくは不発酵茶である緑茶を用いるのがよい。
- [0084] 本発明の茶抽出物は、渋み成分であるポリフェノール類が低減されていることが風味の点より好ましい。
- [0085] 渋み成分であるポリフェノールを除去する方法としては抽出液にポリビニルポリピロリドンを追加する方法 (特開平1-218550号公報) や凍結濃縮により脱水された水と一緒にポリフェノールを除去する方法 (特開2002-325539号公報) 等が一般に知られており利用可能である。
- [0086] 本発明におけるポリフェノール含量の測定方法については特に限定されることはないが、例えば酒石酸鉄比色法、フォーリンチオカルト法が挙げられ、好ましくは酒石酸鉄比色法が望ましい。ポリフェノール含量は、味の面より茶抽出物の固形分中15重量%以下であることが好ましく、更に好ましくは、10重量%以下である。
- [0087] ここで、例えば、ポリフェノール類の採取を目的とした場合にあっては、茶の水又は熱水抽出物からポリフェノール類を抽出した後の残渣が、まさに本発明の「ポリフェノール類を低減させた茶抽出物」に該当する。なお、ポリフェノール類は特定の有機溶媒に溶解しやすい性質を有しているため、例えば特定の有機溶媒を用いて分画を行ったときには大部分が有機溶媒側 (非水溶性画分) に溶解し、水画分には殆ど含ま

れなくなる。つまり、茶葉又は茶葉を粉碎したものを、水又は熱水で抽出し、それを酢酸エチル、アセトン等の溶媒に分配した際の水移行画分より「ポリフェノール類を低減させた茶抽出物」が得られる。また、近年においては、ポリフェノール類の有する種々の機能性に鑑みてポリフェノール類の利用度が高まってきており、茶の熱水抽出物からポリフェノール類を抽出した後の成分はいわば副産物(又は残渣)として取り扱われ、殆ど有効利用されずにそのまま廃棄されていた。その点、本発明によると、これまで有効利用されずに廃棄されていた成分の有効利用が図られるため、茶の熱水抽出物を余すことなく利用できるようになり、経済性の向上及び廃棄物排出量の低減にもつながるという利点もある。

[0088] また、本発明の茶抽出物は、凝血の原因となるプロトロンビン及びフィブリノーゲンの血中濃度を増加させる働きがあるカフェインが低減されていることが好ましい。

[0089] カフェインを除去する方法としては酸性白土を使用する方法(特開平06-142405号公報)や活性炭を使用する方法(特開平08-070772号公報)、合成吸着剤を使用する方法(特開平08-109178号公報)等が一般に知られており利用可能である。

[0090] カフェインの測定方法については特に限定されるものではないが例えば高速液体クロマトグラフィーが挙げられる。カフェイン含量は、茶抽出物の固形分中、2重量%以下であることが好ましく、更に好ましくは1重量%以下である。

[0091] 前述の茶の水又は熱水抽出物の酢酸エチル又はアセトンによる分配品の水画分より茶抽出物を分離する方法はポリフェノールと同時に、カフェインを低減することができるため好ましい。

[0092] 茶の抽出方法は特に限定はないが、例えば、抽出溶媒として水又は熱水を用いる場合、抽出溶媒を、乾燥した抽出原料100重量部に対して、好ましくは500-5000重量部使用すればよい。抽出温度としては、40-100℃が好適である。抽出は静置して又は攪拌下に行えばよい。

[0093] 更に、上記の抽出において、抽出残渣に対して再度抽出工程を1回又はそれ以上繰り返すことで、抽出率が向上するので、好ましい。この場合の抽出に用いる溶媒は、同じでも良いし、別の溶媒を用いても良い。

[0094] 上記の抽出液は、そのままでも使用できるが、濾過や遠心分離により、不溶性物質

を取り除くことにより、抗血栓効果又は抗血小板凝集効果が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。

- [0095] 不溶性物質を取り除いた後、抽出液にエタノールを加えて得られる沈殿物を回収したものは、更に抗血栓効果又は抗血小板凝集効果が高くなるので好ましい。エタノールの濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び作用向上の点より、終濃度として10～50% (v/v) が好ましく、15～45% (v/v) が更に好ましい。
- [0096] 抽出液はそのままでの使用も可能だが、所望により乾燥させて使用することも可能である。
- [0097] 本発明の抗血栓用組成物又は抗血小板凝集用組成物中の茶抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5～100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10～90重量%である。
- [0098] 本発明の抗血栓用組成物又は抗血小板凝集用組成物としては、茶の抽出物が、ポリフェノール類を低減させた茶抽出物である組成物、茶の抽出物が、カフェインを低減させた茶抽出物である組成物、及び茶の抽出物が、ポリフェノール類及び／又はカフェインを低減させた茶抽出物を更にエタノールで分画して得た沈殿物である組成物が好適である。
- [0099] 本発明の抗血栓用組成物における抗血栓とは、特に限定されるものではないが、好ましくは、血栓の生成を抑制する作用(抗凝固作用)のことである。抗血栓効果の測定は、特に限定されるものではないが、例えば、後述の試験例B-1に示すように、内因性血液凝固システムに対する、抗凝固活性を測定する方法において、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定することにより確認することができる。
- [0100] 本発明の抗血小板凝集用組成物における抗血小板凝集とは、血小板の凝集を抑制することをいい、単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例B'-1に示すように、血小板凝集測定機(Aggregometer)を使用して、血小板の浮遊液(Platelet rich plasma)又は採取血液に、凝集を惹起させる物質(ADP、エピネフリン、コラーゲン、アラキドン酸等)を加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。
- [0101] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に

接触できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。

[0102] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。

[0103] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05〜20g/日、好ましくは0.1〜5g/日である。

[0104] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。

[0105] 本発明の組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約50mg〜3g/日、好ましくは100〜500mg/日である。

[0106] (3) ハイビスカス

本発明において具体的には、ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを有効成分として含有することを特徴とする、抗血液凝固組成物、血小板凝集予防組成物、及び血小板凝集予防用組成物が提供される。

[0107] 本発明の組成物は前記ハイビスカス成分が有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、かかるハイビスカス成分について以下の作用を初めて見出した。

[0108] すなわち、前記ハイビスカス成分について、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した結果から、内因性経路に関与する因子を不活性化して、フィブリン形成を阻害し、血管内の血栓生成を抑制する効果が高いことがわかった。

[0109] 前記ハイビスカス成分について、GpIIb-IIIaによりフィブリノーゲンを介して他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集、いわゆるADP惹起血小板凝集の試験結果から、GpIIb-IIIaによ

るフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を抑制することによって血小板凝集血栓形成を抑制する効果が高いことがわかった。

[0110] 前記ハイビスカス成分について、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成による血小板凝集をおこすアゴニストであるリストセチンを加えた時の血小板凝集、いわゆるリストセチン惹起血小板凝集の試験結果から、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を抑制することによって抗血小板凝集効果が高いことがわかった。

[0111] 本発明に用いるハイビスカスとは、学名：ハイビスカス(Hibiscus)といい、和名ではブッソウゲ(仏桑華)と呼ばれている。ハイビスカスは、アオイ科フヨウ属に属する常緑低木で、語源は古代エジプトの美の女神ヒビスに由来している。原産地は、中国南部・中国南部・インド東部・南太平洋諸島・熱帯アフリカである。ハイビスカスはさわやかな酸味があり、最近では、フランス料理やイタリア料理のソースとしても使われており、ハーブとして用いられる食用ハイビスカスは、学名・ハイビスカスサブダリファ／(英)ロゼール・(米)フロリダ克蘭ベリーと呼ばれている種類で、ジャマイカ、スーダン、エジプト、タイ、中国、スリナム、マレーシア等の国で栽培されている。

[0112] 本発明において、ハイビスカスの部位としては、果実、果汁、葉又はその抽出物が用いられ、好ましくは萼及び花に由来する果実弁または葉部の部分が用いられる。その形態は、特に限定するものではなく、生果実、乾燥果実、果実粉末、生葉、乾燥葉、乾燥葉粉末等のいずれでも良い。

[0113] 果汁又は果汁粉末の場合は、そのままでも使用できるが、生果実、乾燥果実、生葉又は乾燥葉等、水不溶性成分を含んでいるので、抽出により、水不溶性成分が除去されていることが好ましい。

[0114] 抽出の際、生果実、乾燥果実、生葉又は乾燥葉を抽出原料として使用する場合は、抽出効率を高めるためにミキサー等により破碎、均質化したものを用いることが好ましい。

[0115] 乾燥果実又は乾燥葉を使用する場合は、抽出効率を高めるために40メッシュ以下の粒度になるように粉碎されていることが好ましい。

[0116] 抽出方法は、抽出溶媒、抽出温度等、特に限定されるものではなく、抽出溶媒としては、水、塩基、酸、親水性溶媒、アセトンを使うことができる。親水性溶媒はメチル

アルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコール群より選ばれる1種類以上が操作性、抽出効率の点から好ましい。特に好ましくは、水、塩基及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1つである。

- [0117] 酸又は塩基を抽出溶媒に使用する場合、抽出物を中和させることが好ましい。中和反応によって生成された塩は、透析法やゲル濾過等、公知の方法により、取り除くことができる。水を抽出溶媒として用いた場合には、上記のような中和反応は必要なく、生成された塩を取り除く必要もないため、水を用いることが更に好ましい。
- [0118] この時使用する酸としては、特に限定するものではなく、大部分の酸を使うことができるが、入手のしやすさの点及び操作性の点により塩酸及び硫酸より選ばれる1種又は両者の併用が好ましい。
- [0119] また、塩基としては、特に限定するものではなく、大部分の塩基を使うことができるが、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムより選ばれる1種又は両者の併用が好ましい。
- [0120] 抽出に使用される酸又は塩基の濃度は、抽出物を酵素処理する前であっても後であっても特に限定するものではなく、酸又は塩基の強さによって変化するが、操作性及び抽出効率の点より、0.01〜0.5モルの濃度を使用することが好ましい。通常、酸又は塩基は、かかる濃度の水溶液として使用される。
- [0121] 抽出溶媒は、乾燥した抽出原料100重量部に対して、好ましくは500〜5000重量部使用すればよい。抽出温度としては、40〜70℃が好適である。抽出は静置して又は攪拌下に行えばよい。
- [0122] 更に、上記の抽出において、抽出残渣に対して再度抽出工程を1回又はそれ以上繰り返すことで、抽出効率が向上し、収率が向上するので、好ましい。この場合の抽出に用いる溶媒は、同じでも良いし、別の溶媒を用いても良い。
- [0123] 上記の抽出液は、そのままで使用できるが、濾過、遠心分離及び分留により、不溶性物質及び溶媒を取り除くことにより、抗血液凝固効果又は抗血小板凝集効果が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。
- [0124] なお、以上の本発明の各組成物に使用する抽出物の抽出操作において、併せて酵素処理することによって収率や風味の改善ができ、また作用の高いものが得られる

ので、抽出原料の抽出前及び／又は抽出時に酵素処理をすることが好ましい。酵素処理する時のpHは使用する酵素の至適pH及びpH安定性を指標に適宜選択できる。また、処理するときの温度に関しても使用する酵素の至適温度及び温度安定性を指標に適宜選択できる。本発明の酵素処理に使用する酵素は限定するものではないが、食品工業用に用いるものであれば、特に限定するものではなく、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、トランスグルコシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、グルタミナーゼ、ヌクレアーゼ、デアミナーゼ、デキストラナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ラクターゼ、タンナーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、プルラナーゼ、トリプシン、パパイン、レンネット、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>等より選ばれる1種類又は2種類以上が挙げられる。好ましくは、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、及びタンナーゼより選ばれる1種類又は2種類以上を併用することができる。酵素の使用量は特に限定するものではないが、酵素の種類によっても異なるが、乾燥した抽出原料100重量部に対して0.05〜2重量部使用することが好ましい。なお、酵素処理は同様にしてハイビスカスの果実、果汁又は葉に対して行ってもよい。

[0125] 従って、以上の本発明の組成物としては、酵素処理してなる、ハイビスカスの果実、果汁、葉又はそれらの抽出物を含有する組成物がより好適である。

[0126] 一方、上記のようにして不溶性物質及び溶媒を取り除いた後、果汁又は抽出液をそのまま又は濃縮した後には有機溶媒を用いて分配を行い、それぞれの溶媒可溶画分を得てもよい。これら溶媒可溶画分は、更に抗血液凝固効果又は抗血小板凝集効果が高くなるので好ましい。有機溶媒としてはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコールや酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、アセトン又はクロロホルムが使用できる。また可溶画分の純度を上げる為には、他の疎水性溶媒による分配を組み合わせることもできるが、エチルアルコール好ましい。これら溶媒の濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び効果の点より、終濃度として20〜80% (v/v) が好ましく、20〜60% (v/v) が更に好ましい。

- [0127] さらに純度を高める為に、フェノール系、スチレン系、アクリル酸系、エポキシアミン系、ピリジン系、メタクリル系などを母体とした疎水性樹脂を用いたクロマトグラフィーやカラムによる精製を行ってもよい。その場合、樹脂吸着後の溶離液としては、メチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールなどの低級アルコール及びアセトンを単独で又は水溶液として使用できる。
- [0128] 抽出液及び画分はそのままでの使用も可能だが、所望により噴霧乾燥や凍結乾燥等の手段により乾燥粉末化させて使用することも可能である。
- [0129] 本発明の抗血液凝固組成物中のハイビスカスの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、ハイビスカスの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10〜95重量%であり、ハイビスカスの葉の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%であり、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。
- [0130] 本発明の血小板凝集予防組成物又は血小板凝集予防用組成物中のハイビスカスの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、ハイビスカスの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10〜95重量%であり、ハイビスカスの葉の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%であり、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。
- [0131] 本発明の抗血液凝固組成物、血小板凝集予防組成物又は血小板凝集予防用組成物としては、ハイビスカスの果実、果汁又は葉の抽出物が、ハイビスカスの果実、



果汁又は葉から水、塩基、酸、親水性溶媒及びアセトンからなる群より選ばれる少なくとも1種により抽出されてなる組成物、及びハイビスカスの果実、果汁又は葉の抽出物の有機溶媒、好ましくはメチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、又はクロロホルムからなる群より選ばれる少なくとも1種による分画物を含有する組成物が好適である。

[0132] 本発明の抗血液凝固組成物における抗血液凝固効果は、例えば、後述の試験例C-2に示すように、内因性血液凝固システムに対する抗血液凝固活性を測定する方法である活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定することにより確認することができる。

[0133] 本発明の血小板凝集予防組成物における血小板凝集とは、血小板の凝集を抑制することをいい、単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例C'-1に示すように、全血血小板凝集測定装置(Aggregometer)を使用して、採取血液に、GpIIb-IIIaによるフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0134] 本発明の血小板凝集予防用組成物における抗血小板凝集とは、血小板の凝集を抑制することをいい、単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例C''-1に示すように、全血血小板凝集測定装置(Aggregometer)を使用して、採取血液に、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成による血小板凝集をおこすアゴニストであるリストセチンを加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0135] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に接触できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。

[0136] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。

- [0137] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05〜20g/日、好ましくは0.1〜5g/日である。
- [0138] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。
- [0139] 本発明の抗血液凝固組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約50mg〜2g/日、好ましくは100〜500mg/日である。
- [0140] 本発明の血小板凝集予防組成物又は血小板凝集予防用組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約40mg〜3g/日、好ましくは100〜500mg/日である。
- [0141] (4)オナモミ
- 本発明において具体的には、オナモミの果実、果汁、種子及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを有効成分として含有することを特徴とする、血小板凝集血栓抑制組成物、及び血小板凝集血栓抑制用組成物が提供される。
- [0142] 本発明の組成物は前記オナモミ成分が有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、かかるオナモミ成分について以下の作用を初めて見出した。
- [0143] すなわち、前記オナモミ成分について、GpIIb-IIIaによるフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集、いわゆるADP惹起血小板凝集の試験結果から、GpIIb-IIaによるフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を抑制することによって血小板凝集血栓形成を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0144] 前記オナモミ成分について、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成による血小板凝集をおこすアゴニストであるリストセチンを加えた時の血小板凝集、いわゆるリストセチン惹起血小板凝集の試験結果から、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を抑制することによって血小板凝集血栓形成を抑制する効果が高いことが

わかった。

- [0145] 本発明に用いるオナモミとは、学名：キサナンティウム ストルマリウム(*Xanthium strumarium* L.)といい、キク科オナモミ属に属する一年草で高さは約1メートル、全体に短い剛毛がある。種子は茎に互生し、形はほぼ心臓形をしており、先は尖り、種子縁は不揃えに切れ込み、質は厚めでやや堅く短毛がある。夏には分かれた枝先に、黄緑色の頭状花を円錐状につける。雄性花は上方について緑色の堅い刺毛があり、雌性花は下方につく。果実は総苞につつまれたままで周囲に刺があり、衣服や動物の毛に附着して散布される。オナモミは、世界に約20種あるが、原産地はアジア大陸で、世界に広く分布しているが、特にアメリカ大陸に多く分布している。古代ローマ人が髪を黄色に染める染料として用いたことから属名は、ギリシャ語の黄に由来するクサントス(Xanthos)、日本では種子を揉んでつけると虫さされに効くところから「オナモミ(生揉み)」の名前が付いたとも言われている。英名でクックレーバ(Cocklebur)とも称されている。オナモミの成熟した果実を天日で乾燥させたものを生薬で、蒼耳子(そうじし)といい、解熱、発汗、頭痛薬として用いられている。ヨーロッパや北アフリカでは家畜の飼料として使用されており、またリンパ腺の腫れをとる薬として用いていた。
- [0146] 本発明において、オナモミの部位としては、果実、果汁、萼、花卉又は種子が用いられる。その形態は、特に限定するものではなく、果実の場合は未熟果実、完熟果実、果汁粉末等のいずれでも良い。
- [0147] 果汁又は果汁粉末の場合は、そのままでも使用できるが、生果実又は乾燥果実等、水不溶性成分を含む物を使用する場合は、抽出により、水不溶性成分が除去されていることが効果を上げる点で好ましい。
- [0148] 抽出の際、生果実を抽出原料として使用する場合は、種子を除去した後、水を添加又は無添加で、抽出効率を高めるためにミキサー等により破碎、均質化したものを用いることが好ましい。
- [0149] 乾燥果実及び乾燥種子を抽出原料として使用する場合は、抽出効率を高めるために40メッシュ以下の粒度になるように粉碎されていることが好ましい。
- [0150] 抽出方法は、抽出溶媒、抽出温度等、特に限定されるものではなく、抽出溶媒とし

ては、水、塩基、酸、親水性溶媒、アセトンを使うことができる。親水性溶媒はメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコール群より選ばれる1種類以上が操作性、抽出効率の点から好ましい。特に好ましくは、水、塩基及び酸からなる群より選ばれる少なくとも1種である。

- [0151] 酸又は塩基を抽出溶媒に使用する場合、抽出物を中和させることが好ましい。中和反応によって生成された塩は、透析法やゲル濾過等、公知の方法により、取り除くことができる。水を抽出溶媒として用いた場合には、上記のような中和反応は必要なく、生成された塩を取り除く必要もないため、水を用いることが更に好ましい。
- [0152] この時使用する酸としては、特に限定するものではなく、大部分の酸を使うことができるが、入手のしやすさの点及び操作性の点により塩酸及び硫酸より選ばれる1種又は両者の併用が好ましい。
- [0153] また、塩基としては、特に限定するものではなく、大部分の塩基を使うことができるが、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムより選ばれる1種又は両者の併用が好ましい。
- [0154] 抽出に使用される酸又は塩基の濃度は、抽出物を酵素処理する前であっても後であっても特に限定するものではなく、酸又は塩基の強さによって変化するが、操作性及び抽出効率の点より、0.01〜0.5モルの濃度を使用することが好ましい。通常、酸又は塩基は、かかる濃度の水溶液として使用される。
- [0155] 抽出溶媒は、乾燥した抽出原料100重量部に対して、好ましくは500〜5000重量部使用すればよい。抽出温度としては、40〜70℃が好適である。抽出は静置して又は攪拌下に行えばよい。
- [0156] 更に、上記の抽出において、抽出残渣に対して再度抽出工程を1回又はそれ以上繰り返すことで、抽出効率が向上し、収率が向上するので、好ましい。この場合の抽出に用いる溶媒は、同じでも良いし、別の溶媒を用いても良い。
- [0157] 抽出液は、そのままでも使用できるが、濾過、遠心分離及び分留により、不溶性物質及び溶媒を取り除くことにより、抗血小板凝集効果が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。
- [0158] なお、以上の本発明の各組成物に使用する抽出物の抽出操作において、併せて

酵素処理することによって収率や風味の改善ができ、また作用の高いものが得られるので、抽出原料の抽出前及び／又は抽出時に酵素処理をすることが好ましい。酵素処理する時のpHは使用する酵素の至適pH及びpH安定性を指標に適宜選択できる。また、処理するときの温度に関しても使用する酵素の至適温度及び温度安定性を指標に適宜選択できる。本発明の酵素処理に使用する酵素は限定するものではないが、食品工業用に用いるものであれば、特に限定するものではなく、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、トランスグルコシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、グルタミナーゼ、ヌクレアーゼ、デアミナーゼ、デキストラナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ラクターゼ、タンナーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、プルラナーゼ、トリプシン、パパイイン、レンネット、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>等より選ばれる1種類又は2種類以上が挙げられる。好ましくは、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、及びタンナーゼより選ばれる1種類又は2種類以上を併用することができる。酵素の使用量は特に限定するものではないが、酵素の種類によっても異なるが、乾燥した抽出原料100重量部に対して0.05〜2重量部使用することが好ましい。なお、酵素処理は同様にしてオナモミの果実、果汁又は種子に対して行ってもよい。

[0159] 従って、以上の本発明の組成物としては、酵素処理してなる、オナモミの果実、果汁、種子又はそれらの抽出物を含む組成物がより好適である。

[0160] 一方、上記のようにして不溶性物質及び溶媒を取り除いた後、果汁又は抽出液をそのまま又は濃縮した後に有機溶媒を用いて分配を行い、それぞれの溶媒可溶画分を得てもよい。これら溶媒可溶画分は、更に抗血小板凝集効果が高くなるので好ましい。有機溶媒としてはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコールや酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、アセトン又はクロロホルムが使用できる。また可溶画分の純度を上げる為には、他の疎水性溶媒による分配を組み合わせることもできるが、エチルアルコール好ましい。これら溶媒の濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び効果の点より、終濃度として20〜80% (v/v) が好ましく、20〜60% (v/v) が更に好ましい。

- [0161] さらに純度を高める為に、フェノール系、スチレン系、アクリル酸系、エポキシアミン系、ピリジン系、メタクリル系などを母体とした疎水性樹脂を用いたクロマトグラフィーやカラムによる精製を行ってもよい。その場合、樹脂吸着後の溶離液としては、メチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールなどの低級アルコール及びアセトンを単独で又は水溶液として使用できる。
- [0162] 抽出液及び画分はそのままでの使用も可能だが、所望により噴霧乾燥や凍結乾燥等の手段により乾燥粉末化させて使用することも可能である。
- [0163] 本発明の血小板凝集血栓抑制組成物又は血小板凝集血栓抑制用組成物中のオナモミの果実の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、オナモミの果汁の含有量としては、乾物換算で、好ましくは5〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは10〜95重量%であり、オナモミの種子の含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%であり、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、それらの抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。
- [0164] 本発明の血小板凝集血栓抑制組成物又は血小板凝集血栓抑制用組成物としては、オナモミの果実、果汁又は種子の抽出物が、オナモミの果実、果汁又は種子から水、塩基、酸、親水性溶媒及びアセトンからなる群より選ばれる少なくとも1種により抽出されてなる組成物、オナモミの果実、果汁又は種子の抽出物の有機溶媒、好ましくはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、又はクロロホルムからなる群より選ばれる少なくとも1種による分画物を含有する組成物が好適である。
- [0165] 本発明の血小板凝集血栓抑制組成物における血小板凝集血栓抑制とは、血小板の凝集を抑制して血栓の形成を抑制することをいい、血小板凝集は単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例D-1に示すよ

うに、全血血小板凝集測定装置(Aggregometer)を使用して、採取血液に、GpIIb-IIIaによるフィブリンノーゲンを介する他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0166] 本発明の血小板凝集血栓抑制用組成物における血小板凝集血栓抑制とは、血小板の凝集を抑制して血栓の形成を抑制することをいい、血小板凝集の抑制は単に抗血小板(Antiplatelet)ともよばれる。抗血小板活性は、例えば、後述の試験例D'-1に示すように、全血血小板凝集測定装置(Aggregometer)を使用して、採取血液に、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成による血小板凝集をおこすアゴニストであるリストセチンを加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0167] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に接触できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。

[0168] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。

[0169] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05〜20g/日、好ましくは0.1〜5g/日である。

[0170] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。

[0171] 本発明の組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約40mg〜3g/日、好ましくは100〜500mg/日である。

[0172] (5) ギムネマ

本発明において具体的には、ギムネマ、その抽出物又はそれらの混合物を有効成

分として含有することを特徴とする血栓形成抑制剤が提供される。

- [0173] 本発明の組成物は前記ギムネマ成分が有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、かかるギムネマ成分について以下の作用を初めて見出した。
- [0174] すなわち、前記ギムネマ成分について、血小板凝集試験の結果から、血小板凝集物の生成を抑制する効果が高いことがわかった。すなわち、前記ギムネマ成分について、GpIIb-IIIaによりフィブリノーゲンを介して他の血小板との結合段階を惹起させて血小板凝集をおこすアゴニストであるADPを加えた時の血小板凝集、いわゆるADP惹起血小板凝集の試験結果から、GpIIb-IIIaによるフィブリノーゲンを介する他の血小板との結合段階を抑制することによって血小板凝集を抑制する効果が高いことがわかった。
- [0175] 本発明に用いるギムネマとは、学名：ギムネマ・シルヴェスタ (*Gymnema Sylvestre*) といい、インド原産として、インドネシア、中国南西部等熱帯から亜熱帯地方にかけて広く分布するガガイモ科 (*Asclepidaceae*) のつる性植物であり、植物分類学上からいえば、日本にも生育しているガガイモ、イケマ、トウワタ等と同じ科に属する植物である。
- [0176] 本発明において、ギムネマの部位としては、通常、葉、茎、蔓の群より選ばれる1種又は2種以上が用いられる。その形態は、特に限定するものではない。粉末の場合は、そのままでも使用できるが、水等による抽出により、水不溶性成分が除去されていることが好ましい。
- [0177] 抽出方法は、抽出溶媒、抽出温度等、特に限定されるものではなく、抽出溶媒としては、水、塩基、酸、アルコール類、その他食塩水等の非有機溶媒を使うことができ、好ましくは、水、塩基、酸及びアルコール類からなる群より選ばれる1種以上である。
- [0178] 酸又は塩基を抽出溶媒で使う場合、抽出物を中和させることが好ましい。中和反応によって生成された塩は、透析法やゲル濾過等、公知の方法により、取り除くことができる。水を抽出溶媒として用いた場合には、上記のような中和反応は必要なく、生成された塩を取り除く必要もないため、水を用いることが更に好ましい。
- [0179] この時使用する酸としては、特に限定するものではなく、大部分の酸を使うことがで



きるが、好ましくは、塩酸及び硫酸より選ばれる1種又は両者の併用である。

[0180] また、塩基としては、特に限定するものではなく、大部分の塩基を使うことができるが、好ましくは、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムより選ばれる1種又は両者の併用である。

[0181] 抽出に使用される酸又は塩基の濃度は、特に限定するものではなく、酸又は塩基の強さによって変化するが、0.01〜0.5モルの濃度を使用することが好ましい。通常、酸又は塩基は、かかる濃度の水溶液として使用される。

[0182] 本発明におけるアルコール類とは、特に限定するものではないが、好ましくは、飲食品用素材の調製に使用できるものであり、更に好ましくは、エタノール、イソプロピルアルコール、プロピレングリコール及びグリセリンからなる群より選ばれる1種以上であり、最も好ましくは、エタノールである。

[0183] 抽出溶媒は、乾燥した抽出原料100重量部に対して、好ましくは500〜5000重量部使用すればよい。抽出温度としては、40〜70℃が好適である。抽出は静置して又は攪拌下に行えばよい。

[0184] 更に、上記の抽出において、抽出残渣に対して再度抽出工程を1回又はそれ以上繰り返すことで、抽出率が向上し、収率が向上するので、好ましい。この場合の抽出に用いる溶媒は、同じでも良いし、別の溶媒を用いても良い。

[0185] 上記の抽出液は、そのままでも使用できるが、濾過や遠心分離により、不溶性物質を取り除くことにより、血栓形成抑制効果が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。

[0186] 不溶性物質を取り除いた後、抽出液をそのまま又は濃縮した後にエタノールを加えて得られる上澄み(可溶性画分を含む)を回収したものは、更に血栓形成抑制効果が高くなるので好ましい。エタノールの濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び効果の点より、終濃度として10〜95% (v/v) が好ましく、60〜90% (v/v) が更に好ましい。

[0187] 抽出液はそのままでの使用も可能だが、所望により噴霧乾燥や凍結乾燥等の手段により乾燥粉末化させて使用することも可能である。

[0188] 本発明の血栓形成抑制剤中のギムネマの含有量としては、乾物換算で、好ましくは

10～100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20～90重量%であり、その抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1～100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5～95重量%である。

[0189] 本発明の血栓形成抑制剤としては、ギムネマの抽出物が、水、塩基、酸、アルコール類の群より選ばれる1種以上を用いて抽出されたものである血栓形成抑制剤、及びギムネマの抽出物が、更にエタノールにより分画された可溶性画分である血栓形成抑制剤が好適である。

[0190] 本発明の血栓形成抑制剤における血栓形成抑制とは、特に限定するものではないが、好ましくは、主として抗血小板凝集による血栓形成の抑制のことである。抗血小板凝集とは、血小板の凝集を抑制することをいい、単に抗血小板 (Antiplatelet) ともよばれる。血栓形成抑制効果は抗血小板活性として、例えば、後述の試験例E-1に示すように、血小板凝集測定機 (Aggregometer) を使用して、血小板の浮遊液 (Platelet rich plasma) 又は採取血液に、凝集を惹起させる物質 (ADP、エピネフリン、コラーゲン、アラキドン酸等) を加えた時の血小板凝集率を測定する方法により確認することができる。

[0191] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に摂食できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。

[0192] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。

[0193] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05～20g/日、好ましくは0.1～5g/日である。

[0194] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。

[0195] 本発明の組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で

、通常、成人1人体重50kg当たり約50mg〜2g／日、好ましくは100〜500mg／日である。

[0196] (6)ヒジキ

本発明において具体的には、ヒジキ、その抽出物、又はそれらの混合物を有効成分として含有することを特徴とする、外因系凝固予防組成物、血栓予防組成物、及び血栓予防用組成物が提供される。

[0197] 本発明の組成物は前記ヒジキ成分が有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、かかるヒジキ成分について以下の作用を初めて見出した。

[0198] すなわち、前記ヒジキ成分について、抗凝固試験の結果から、外因系凝固の生成を抑制する効果が高いことがわかった。

[0199] 前記ヒジキ成分について、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した結果から、内因性経路に関与する因子を不活性化して、フィブリン形成を阻害し、血管内の血栓生成を抑制する効果が高いことがわかった。

[0200] 本発明に用いるヒジキとは、学名:ヒジキア・フシフォルミス(*Hijikia fusiformis*)といい、褐藻類、ホンダワラ科に属する海藻である。北海道日高地方以南の太平洋岸、瀬戸内海、兵庫県付近以西の日本海側、九州沿岸に分布する日本近海の特産である。乾物は黒褐色であるが、生の時は黄褐色をしている。ヒジキは波の荒い外洋の岩礁上、低潮線付近に生育し、体は濃緑褐色、根は絡み合った繊維状でよく発達し、岩上を這うように成長する。体の茎は軟骨質で円柱状、太さ3〜4mm、長さ0.5〜1mmであり、茎から細長い円柱状の葉と小枝を側出し、葉は幼体では多肉質で平たく、成体では葉は線形となり3〜10cm、多くは先端が尖り、中がしっかりしているが、しばしば先端が膨らむ棍棒状になったり、中空で気泡をかねるものもあり、春から初夏にかけて繁茂する。渋みが多くそのまま生では食べられないが、鉄釜で数時間水煮することによって渋みが取れ、色素も除かれ、これを日光で乾燥したのが「干しヒジキ」である。干しヒジキのうち小枝部分だけを集めたものが「芽ヒジキ、米ヒジキ又は姫ヒジキ」、茎状の長い部分(主軸部分)ものを「長ヒジキ」と呼ばれている。芽ヒジキは水につけて戻すと、かさで3倍、重さで約6倍になる。また、別称としてひずきも、ねいり、ちょうせんヒジキ、みちヒジキ等とも称されている。

- [0201] 本発明において、ヒジキの部位としては、特に限定されるものではないが、小枝部分及び主軸部分が好適に用いられる。その形態は、特に限定するものではなく、生ヒジキ、干しヒジキ、乾燥ヒジキ、ヒジキ粉末等のいずれでも良い。
- [0202] ヒジキ粉末の場合は、そのままでも使用できるが、水不溶性成分を含んでいるので、抽出により、水不溶性成分が除去されていることが好ましい。
- [0203] 抽出の際、生ヒジキ、干しヒジキ、乾燥ヒジキを抽出原料として使用する場合は、抽出効率を高めるためにミキサー等により破碎、均質化したものを用いることが好ましい。
- [0204] 干しヒジキ又は乾燥ヒジキを抽出原料として使用する場合は、抽出効率を高めるために40メッシュ以下の粒度になるように粉碎されていることが好ましい。
- [0205] 抽出方法は、抽出溶媒、抽出温度等、特に限定されるものではなく、抽出溶媒としては、水、塩基、酸、親水性溶媒、アセトンを使うことができる。親水性溶媒はメチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコール群より選ばれる1種類以上が操作性、抽出効率の点から好ましい。特に好ましくは、水、塩基、酸及び親水性溶媒からなる群より選ばれる少なくとも1種である。
- [0206] 酸又は塩基を抽出溶媒に使用する場合、抽出物を中和させることが好ましい。中和反応によって生成された塩は、透析法やゲル濾過等、公知の方法により、取り除くことができる。水を抽出溶媒として用いた場合には、上記のような中和反応は必要なく、生成された塩を取り除く必要もないため、水を用いることが更に好ましい。
- [0207] この時使用する酸としては、特に限定するものではなく、大部分の酸を使うことができるが、好ましくは、入手しやすさの点、及び操作性の点により塩酸及び硫酸より選ばれる1種又は両者の併用である。
- [0208] また、塩基としては、特に限定するものではなく、大部分の塩基を使うことができるが、好ましくは、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムより選ばれる1種又は両者の併用である。
- [0209] 抽出に使用される酸又は塩基の濃度は、特に限定するものではなく、酸又は塩基の強さによって変化するが、操作性及び抽出効率の点より、0.01〜0.5モルの濃度

を使用することが好ましい。通常、酸又は塩基は、かかる濃度の水溶液として使用される。

[0210] 抽出溶媒は、乾燥した抽出原料100重量部に対して、好ましくは500〜5000重量部使用すればよい。抽出温度としては、40〜70℃が好適である。抽出は静置して又は攪拌下に行えばよい。

[0211] 上記の抽出において、酵素処理することによって収率や風味の改善ができる、また効果の高いものが得られるので、酵素処理をすることは好ましい。酵素処理する時のpHは使用する酵素の至適pH及びpH安定性を指標に適宜選択できる。また、処理する時の温度に関しても酵素の至適温度及び温度安定性を指標に適宜選択できる。本発明の酵素処理に使用する酵素は限定するものではないが、食品工業用に用いるものであれば、特に限定するものではなく、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、トランスグルコシダーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、グルタミナーゼ、ヌクレアーゼ、デアミナーゼ、デキストラナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ラクターゼ、タンナーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、プルラナーゼ、トリプシン、パパイン、レンネット、ホスホリパーゼA2等より選ばれる1種類または2種類を併用することができる。好ましくは、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ、クロロゲン酸エステラーゼ、タンナーゼより選ばれる1種類または2種類を併用することができる。酵素の使用量は特に限定するものではないが、酵素の種類や反応条件によっても異なるが、乾燥した抽出原料100重量部に対して0.05〜2重量部使用するのが好ましい。

[0212] 更に、上記の抽出において、抽出残渣に対して再度抽出工程を1回又はそれ以上繰り返すことで、抽出率が向上し、収率が向上するので、好ましい。この場合の抽出に用いる溶媒は、同じでも良いし、別の溶媒を用いても良い。

[0213] 抽出液は、そのままでも使用できるが、濾過、遠心分離及び分留により、不溶性物質及び溶媒を取り除くことにより、外因系凝固予防効果又は血栓予防効果が高くなり、応用範囲も広がるので好ましい。

[0214] 不溶性物質及び溶媒を取り除いた後、抽出液をそのまま又は濃縮した後に有機溶媒を用いて分配を行い、それぞれの溶媒可溶画分を得てもよい。これら溶媒可溶画

分は、更に外因系凝固予防効果又は血栓予防効果が高くなるので好ましい。有機溶媒としてはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールの低級アルコールや酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、アセトン又はクロロホルムが好適に使用でき、エチルアルコールの使用がより好適である。また可溶画分の純度を上げる為には、他の疎水性溶媒による分配を組み合わせることもできる。これら溶媒の濃度としては、特に限定するものではないが、収率及び効果の点より、終濃度として20〜80% (v/v) が好ましく、20〜60% (v/v) が更に好ましい。

- [0215] さらに純度を高める為に、フェノール系、スチレン系、アクリル酸系、エポキシアミン系、ピリジン系、メタクリル系など母体とした疎水性樹脂を用いたクロマトグラフィーやカラムによる精製を行ってもよい。その場合、樹脂吸着後の溶離液としては、メチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコールなどの低級アルコール及びアセトンを単独で又は水溶液として使用できる。
- [0216] 抽出液及び画分はそのままでの使用も可能だが、所望により噴霧乾燥や凍結乾燥等の手段により乾燥粉末化させて使用することも可能である。
- [0217] 本発明の外因系凝固予防組成物、血栓予防組成物、又は血栓予防用組成物中のヒジキの含有量としては、乾物換算で、好ましくは10〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは20〜90重量%であり、その抽出物の含有量としては、乾物換算で、好ましくは1〜100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5〜95重量%である。
- [0218] 本発明の外因系凝固予防組成物、血栓予防組成物、又は血栓予防用組成物としては、ヒジキ抽出物が、ヒジキから水、塩基、酸、親水性溶媒及びアセトンからなる群より選ばれる少なくとも1種により抽出されてなる組成物、ヒジキ抽出物の有機溶媒、好ましくはメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルエーテル、メチルイソブチルケトン、ヘキサン、又はクロロホルムからなる群より選ばれる少なくとも1種による分画物を含む組成物が好適である。抽出物としては

酵素処理されてなるものがより好適である。

- [0219] 本発明の外因系凝固予防組成物における外因系凝固予防効果は、例えば、後述の試験例F-1に示すように、外因系血液凝固システムに対する抗血液凝固活性を測定する方法であるプロトロンビン時間(prothrombin time:PT)を測定することにより確認することができる。
- [0220] 本発明の血栓予防組成物及び血栓予防用組成物における血栓予防効果は、例えば、内因系血液凝固システムに対する抗血液凝固活性を測定する方法である活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定することにより確認することができる。例えば、本発明の血栓予防組成物については、後述の試験例F'-1により、本発明の血栓予防用組成物については、後述の試験例F''-1により、それぞれ効果を確認することができる。
- [0221] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に摂食できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。
- [0222] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。
- [0223] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05〜20g/日、好ましくは0.1〜5g/日である。
- [0224] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。
- [0225] 本発明の外因系凝固予防組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約50mg〜2g/日、好ましくは100〜500mg/日である。
- [0226] 本発明の血栓予防組成物及び血栓予防用組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約1mg〜40m

g／日、好ましくは2～10mg／日である。

[0227] (7)カラギナン

本発明において具体的には、カラギナンを有効成分として含有することを特徴とする抗血栓剤が提供される。

[0228] 本発明の組成物はカラギナンが有する作用に基づいてその効果を発揮するが、本発明においては、カラギナンについて以下の作用を初めて見出した。

[0229] すなわち、前記カラギナン成分について、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した結果から、内因性経路に關与する因子を不活性化して、フィブリン形成を阻害し、血管内の血栓生成を抑制する効果が高いことがわかった。

[0230] 本発明に用いるカラギナンとは、イバラノリ、キリンサイ、ギンナンソウ、スギノリ又はツノマタ等の海藻から抽出、精製される天然高分子物質で分子量100,000～500,000のガラクトース, 3, 6アンヒドロガラクトースを主成分とする多糖類である。

[0231] 市販のカラギナンが使用可能であり、好ましくは、一度水又は熱水に溶解後、濾過し、不溶性成分を取り除いたものである。

[0232] カラギナンの種類としては、ι-カラギナン、κ-カラギナン、λ-カラギナンのいずれでも良く、また、複数の組合せでも良い。効果の点より、ι-カラギナン又はλ-カラギナンの1種又は複数の組合せが好ましく、λ-カラギナンが更に好ましい。

[0233] 本発明の抗血栓剤中のカラギナンの含有量としては、乾物換算で、好ましくは1～100重量%、該組成物の使用の利便性をも考慮すると、より好ましくは5～95重量%である。

[0234] 本発明における抗血栓とは、特に限定されるものではないが、好ましくは、血栓の生成を抑制する作用 (抗凝固作用) のことである。抗血栓効果は、例えば、後述の試験例G-1に示すように、内因系血液凝固システムに対する、抗凝固活性を測定する方法において、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定することにより確認することができる。

[0235] 本発明の組成物は、飲食品、医薬品、飼料等に応用でき、好ましくは、人が手軽に摂食できる飲食品又は医薬品が好ましい。それらの応用例の詳細については後述する。



- [0236] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量は、投与対象個体の体調、体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜調整すればよい。摂取回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて摂取することができる。
- [0237] 本発明の組成物の飲食品としての摂取量としては、該組成物として、通常、ヒト1人体重50kg当たり0.05～20g/日、好ましくは0.1～5g/日である。
- [0238] 本発明の組成物の医薬品としての投与量は、投与方法、疾患の症状、投与対象の体重、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定すればよい。投与回数、期間、時期等に制限はなく、例えば、1日1回ないし数回にわけて投与することができる。
- [0239] 本発明の組成物の医薬品としての投与量としては、乾燥重量での有効成分の量で、通常、成人1人体重50kg当たり約50mg～2g/日、好ましくは100～500mg/日である。
- [0240] なお、前記(1)～(7)に記載の本発明の血栓形成抑制用組成物における本発明の有効成分以外の成分としては、例えば、デキストリン、環状デキストリン、クラスターデキストリン、難消化性デキストリン、キサント、グアー、グアーガム分解物、アルギン酸等の多糖類、大豆タンパク質等の植物性タンパク質及び大豆ペプチド等の植物性タンパク質の分解物、卵黄、卵白、全卵等の動物性タンパク質及び卵黄、卵白、全卵ペプチド等の動物性タンパク質の分解物、乳糖等のような公知の食品原料成分が挙げられる。本発明の組成物は、それらの公知の成分と本発明の有効成分とを適宜混合して製造することができる。なお、以上の成分は天然物であっても合成物であってもよい。
- [0241] (8) 本発明の組成物の応用例
- 本発明の一態様として、本発明の血栓形成抑制用組成物を含有してなる飲食品が提供される。なお、血栓形成抑制用組成物とは上記いずれかの本発明の組成物を意味する。
- [0242] 本発明における飲食品とは溶液、懸濁物、粉末、固体成形物等、経口摂取可能な形態のものであれば良く特に限定するものではない。当該飲食品中の本発明の血栓形成抑制用組成物の含有量としては、通常、0.01～15重量%が好ましく、0.05～

10重量%がより好ましい。そのような飲食品は、本発明の血栓形成抑制用組成物を原料の一部として配合する以外は公知の飲食品の配合組成及び製造方法に従って製造することができる。

[0243] 本発明における飲食品としては、より具体的には、即席麺、レトルト食品、缶詰、電子レンジ食品、即席スープ・みそ汁類、フリーズドライ食品等の即席食品類、清涼飲料、果汁飲料、野菜飲料、豆乳飲料、コーヒー飲料、茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、栄養飲料、アルコール飲料等の飲料類、パン、パスタ、麺、ケーキミックス、から揚げ粉、パン粉等の小麦粉製品、飴、キャラメル、チューイングガム、チョコレート、クッキー、ビスケット、ケーキ、パイ、スナック、クラッカー、和菓子、デザート菓子等の菓子類、ソース、トマト加工調味料、風味調味料、調理ミックス、たれ類、ドレッシング類、つゆ類、カレー・シチューの素等の調味料、加工油脂、バター、マーガリン、マヨネーズ等の油脂類、乳飲料、ヨーグルト類、乳酸菌飲料、アイスクリーム類、クリーム類等の乳製品、冷凍食品、魚肉ハム・ソーセージ、水産練り製品等の水産加工品、畜肉ハム・ソーセージ等の畜産加工品、農産缶詰、ジャム・マーマレード類、漬け物、煮豆、シリアル等の農産加工品、栄養食品、錠剤、カプセル等が例示される。

[0244] なお、本発明の血栓形成抑制用組成物、又はそれを含有する飲食品に対し各種栄養成分を強化することができる。

[0245] 強化できる栄養成分としては、特に限定はないが、ビタミンA、ビタミンB<sub>1</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ナイアシン(ニコチン酸)、パントテン酸、葉酸等のビタミン類、リジン、スレオニン、トリプトファン等の必須アミノ酸類や、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅等のミネラル類及び、例えば、 $\alpha$ -リノレン酸、EPA、DHA、月見草油、オクタコサノール、カゼインホスホペプチド(CPP)、カゼインカルシウムペプチド(CCP)、水溶性食物繊維、不溶性食物繊維、オリゴ糖等の人の健康に寄与する物質類、その他の食品や食品添加物として認可されている有用物質の1種又は2種以上が使用できる。

[0246] また、本発明の一態様として、本発明の血栓形成抑制用組成物を含有してなる医薬部外品及び医薬品が提供される。なお、血栓形成抑制用組成物とは上記いずれかの本発明の組成物を意味する。

- [0247] 本発明における医薬部外品及び医薬品とは、経口又は非経口投与に適した賦形剤、その他の添加剤と本発明の血栓形成抑制用組成物とを配合し、常法に従って、例えば、経口製剤又は注射剤として調製することができる。好ましいのは経口製剤、例えば、経口固形製剤又は経口液状製剤であり、もっとも好ましいのは、容易に服用でき且つ保存、持ち運びに便利な経口固形製剤である。当該医薬部外品及び医薬品中の本発明の血栓形成抑制用組成物の含有量としては、通常、0.1〜300重量％が好ましく、1〜100重量％がより好ましい。
- [0248] 経口固形製剤としては、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、徐放剤等が挙げられる。このような固形製剤においては、適宜の薬理学的に許容され得る担体、賦形剤（例えばデンプン、乳糖、白糖、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムなど）、結合剤（例えばデンプン、アラビアガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、アルギン酸、ゼラチン、ポリビニルピロリドンなど）、滑沢剤（例えばステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムなど）、崩壊剤（例えばカルボキシメチルセルロース、タルクなど）などと本発明の血栓形成抑制用組成物とを混合し、常法により錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、徐放剤等として製造することができる。
- [0249] 経口液状製剤は、製薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エチルアルコールを含む。かかる製剤は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。
- [0250] 非経口投与用としての注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エチルアルコールのようなアルコール類、ポリソルベート80等がある。注射剤は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えばラクトース）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保管フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これ

らはまた無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

[0251] さらに、本発明の一態様として、本発明の血栓形成抑制用組成物を含有してなる飼料が提供される。なお、血栓形成抑制用組成物とは上記いずれかの本発明の組成物を意味する。

[0252] 本発明における飼料は、本発明の血栓形成抑制用組成物を原料の一部として配合する以外は公知の飼料の配合組成及び製造方法に従って製造することができる。当該飼料中の本発明の血栓形成抑制用組成物の含有量としては、通常、0.01〜15重量%が好ましく、0.05〜10重量%がより好ましい。

[0253] 該飼料を適用し得る生物としては特に限定はなく、例えば、養殖動物、ペット動物などが挙げられ、養殖動物としてはウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽が挙げられ、ペット動物としてはイヌ、ネコなどが挙げられる。

[0254] なお、本発明においては有効成分として植物体、その果実、葉、又は種子を使用するが、それらは、そのまま直接使用される他、乾燥物、破碎物、粉碎物等、公知の方法に従って物理的な処理を施して種々の形態で使用される。従って、本発明においては、そのような物理的処理を施した後のものも植物体、その果実、葉、又は種子として扱う。また、物理的処理を施した後の植物体、その果実、葉、又は種子を単独若しくは2種以上で、例えば、デキストリン、環状デキストリン、クラスターデキストリン、難消化性デキストリン、キサンタン、グアー、グアーガム分解物、アルギン酸等の多糖類、大豆タンパク質等の植物性タンパク質及び大豆ペプチド等の植物性タンパク質の分解物、卵黄、卵白、全卵等の動物性タンパク質及び卵黄、卵白、全卵ペプチド等の動物性タンパク質の分解物、乳糖等の賦形剤、デンプン、セルロース、アラビアガム、ブドウ糖等の結合剤、ゼラチン、寒天、セルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、シュガーエステル類、グリセリン脂肪酸エステル類等の滑沢剤と混合し固めたものも本発明の組成物、飲食品、医薬部外品、医薬品、飼料に包含される。

[0255] 以上のような本発明の組成物の応用例である飲食品等は、本発明の血栓形成抑制用組成物を含むことから、本発明の個々の組成物が発揮する作用効果により血栓

形成抑制効果を発揮し得る。

## 実施例

[0256] 以下本発明を、実施例にて詳細に説明するが、次の実施例は、本発明の範囲を限定するものではない。有効成分として使用される植物成分の起源となる植物ごとに実施例を示す。

[0257] [アムラー]

### 実施例A-1 抗血栓組成物の調製1

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを入れ、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2リットルを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせて、本発明の抗血栓組成物Aを得た。

なお、得られた抽出液は固形分として70.8gであり、収率は88.5%であった。

[0258] 試験例A-1 抗血栓効果の確認

本発明の抗血栓組成物の抗凝固活性を、人間の血液から分離した乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma, PPP)を利用して凝固計(Coagulometer; シスメックス社製)で測定した。

[0259] 反応キュベットに、試料10マイクロリットル、APTT試薬(国際試薬社製)25マイクロリットル、10%セファリン25マイクロリットルを入れて、37℃で3分間反応させた後、PPP50マイクロリットルを入れて、2分間反応させた。最後に、25ミリモル塩化カルシウム50マイクロリットルを入れて、凝固させて、血漿が凝固されるまでの時間(秒)を測定し、APTTとした。

[0260] この時、対照に水を入れ、同じ方法でAPTTを測定した。測定された試料のAPTTから、下記の数式によって、対照に対する抗凝固活性(%)を計算した。

$$\text{抗凝固活性(\%)} = ((\text{試料のAPTT} - \text{対照のAPTT}) / \text{対照のAPTT}) \times 100$$

[0261] 本発明の抗血栓組成物Aの濃度と、抗凝固活性との関係を確認するために、固形分濃度として、0(対照)、1、3、5mg/mLの本発明の抗血栓組成物を使用して、そ

の活性を測定した。その結果を、下記表1に示す。

[0262] [表1]

濃度	APTT (秒)	抗凝固活性 (%)
0mg/mL	45	0
1mg/mL	49	8.9
3mg/mL	55	22.2
5mg/mL	68	51.1

[0263] 上記表1の結果により、本発明の抗血栓組成物が高い抗凝固活性を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例的に抗凝固活性も増加することが確認できた。

[0264] 実施例A-2 抗血栓組成物の調製2

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを入れ、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2リットルを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせて、減圧濃縮し、200ミリリットルとした。この濃縮液にエタノールを加え、1リットルになるように調製(最終エタノール濃度80%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。沈殿物を、遠心分離で分離し、減圧乾燥後、水1リットルに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍結乾燥して本発明の抗血栓組成物B30.8g(収率38.5%)を得た。

[0265] 試験例A-2 抗血栓効果の確認

実施例A-2で得られた抗血栓組成物Bについて、5mg/mLの濃度で、試験例A-1と同様にしてAPTTを測定した。その結果、APTTは、85.1秒であり、抗凝固活性は、89.1%と、水抽出のみの抗血栓組成物Aに比べて高い抗凝固活性を示すことが確認できた。

[0266] なお、実施例A-2において、エタノール可溶性成分についても同様にしてAPTTを測定した結果、APTTは、48.0秒であり、抗凝固活性は、6.7%であり、抗血栓

活性画分はエタノールによる沈殿画分に含まれることがわかった。

[0267] 実施例A'-1 フィブリン形成阻害組成物の調製1

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを加え、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2リットルを加え、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、凍結乾燥し、本発明のフィブリン形成阻害組成物A35.0グラムを得た。収率は43.8%であった。

[0268] 試験例A'-1 フィブリン形成阻害効果の確認1

本発明のフィブリン形成阻害組成物のフィブリン形成阻害効果について、フィブリノーゲン試液とトロンビン試液を利用してフィブリン形成の割り合いを調べた。

[0269] 試験管に、0.7%フィブリノーゲン試液3ミリリットルに実施例A'-1で得られたフィブリン形成阻害組成物Aを生理食塩液で一定濃度に希釈したものを300マイクロリットルを加えて、37℃で3分間均一化させた後、トロンビン試液(10U/mL)300マイクロリットルを添加して、フィブリン形成凝固させた。その凝固重量(g)を測定し、下記計算式によってフィブリン形成阻害率を求めた。

$$\text{フィブリン形成阻害率(\%)} = ((\text{全体溶液重量} - \text{凝固重量}) / \text{全体溶液重量}) \times 100$$

[0270] この時、対照にはフィブリン形成阻害組成物の代わりに生理食塩液水を入れ、同じ方法でフィブリン形成阻害率を測定した。

[0271] 本発明のフィブリン形成阻害組成物の濃度と、フィブリン形成阻害率との関係を確認するために、固形分濃度として、0(対照)、10、25、40mg/mLの本発明のフィブリン形成阻害組成物を使用して、その阻害率を測定した。その結果を、下記表2に示す。

[0272] [表2]

濃度	凝固重量 (g)	フィブリン形成阻害率 (%)
0mg/mL	3.65	0
10mg/mL	2.37	31.2
25mg/mL	1.14	64.9
40mg/mL	0	100

[0273] 上記表2の結果により、本発明のフィブリン形成阻害組成物は、血栓形成の最終過程でのフィブリン形成に対して高い阻害効果を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例してフィブリン形成阻害率も増加することが確認できた。

[0274] 実施例A'-2 フィブリン形成阻害組成物の調製2

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100グラムに、蒸留水2リットルを加え、さらにペクチナーゼ0.1グラム及びタンナーゼ0.1グラムを加えて、55℃で2時間抽出した。その後、90℃で30分間酵素失活させた。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、濾液をスプレードライし、本発明のフィブリン形成阻害組成物B45gを得た。

[0275] 実施例A'-3 フィブリン形成阻害組成物の調製3

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを加え、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2リットルを加え、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、減圧濃縮し、200ミリリットルとした。この濃縮液にエタノールを加え、250ミリリットルになるように調製(最終エタノール濃度20%)した後、4℃で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。上清を遠心分離(3000rpm、10分間)で分離除去し、沈殿物を凍結乾燥し、本発明のフィブリン形成阻害組成物C8.5gを得た。

[0276] また、最終エタノール濃度20%の上清にエタノールを加えてエタノールの終濃度を40%にして沈殿物させ、同様にして本発明のフィブリン形成阻害組成物D4.6gを、



さらに同様の操作を繰り返してエタノールの終濃度を60%、さらに80%にして沈殿物を得て、本発明のフィブリン形成阻害組成物E1. 3g, F2. 4gを得た。

[0277] 試験例A'-2 フィブリン形成阻害効果の確認2

実施例A'-2で得られたフィブリン形成阻害組成物Bと実施例A'-3で得られたフィブリン形成阻害組成物C-Fについて、それぞれを生理食塩水で希釈し、10mg/mLとした試料濃度で、試験例A'-1と同様にしてフィブリン形成阻害効果を確認した。

[0278] また、実施例A'-3における、60-80%エタノールでの上清成分についても同様にして試料を調製し、フィブリン形成阻害効果を確認した。その結果を表3に示す。

[0279] [表3]

試料	凝固重量 (g)	フィブリン形成阻害率 (%)
0mg/mL	3.65	0
フィブリン形成阻害組成物B	2.14	41.4
フィブリン形成阻害組成物C (0-20%エタノール沈殿成分)	2.01	44.9
フィブリン形成阻害組成物D (20-40%エタノール沈殿成分)	2.34	35.9
フィブリン形成阻害組成物E (40-60%エタノール沈殿成分)	1.32	63.8
フィブリン形成阻害組成物F (60-80%エタノール沈殿成分)	0	100
60-80%エタノール上清成分	2.82	22.7

[0280] 上記表3の結果により、フィブリン形成阻害画分はエタノール沈殿画分の60-80%エタノール沈殿画分が最も活性が高いことがわかった。

[0281] 実施例A''-1 抗血小板凝集組成物の調製1

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを入れ、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2リットルを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、凍結乾燥し、本発明の抗血小板凝集組成物

Aを35g得た。

[0282] 試験例A' -1 抗血小板活性の確認

本発明の抗血小板凝集組成物の抗血小板活性を以下のようにして求めた。血小板凝集測定機(Aggregometer;アイエスケー社製)を使用して、健常人の血小板の浮遊液(platelet rich plasma)400  $\mu$  Lに、試料80  $\mu$  Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質としてADP(1mg/mL溶液)20  $\mu$  Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0283] 別途、対照として水(試料濃度0mg/mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板活性(%)を計算した。

$$\text{抗血小板活性(\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0284] 試料濃度として、2.5、5.0、7.5mg/mLで測定した結果を、表4に示す。

[0285] [表4]

試料濃度	抗血小板活性 (%)
2.5mg/mL	24.4
5.0mg/mL	37.8
7.5mg/mL	53.7

[0286] 上記表4の結果により、本発明の抗血小板凝集組成物が高い抗血小板活性を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板活性も増加することが確認できた。

[0287] 実施例A' -2 抗血小板凝集組成物の調製2

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを入れ、55°Cで3時間抽出した。その後、遠心分離し、その上清を濾過し、抽出物

と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2リットルを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせて、減圧濃縮し、200ミリリットルとした。この濃縮液にエタノールを加え、250ミリリットルになるように調製(最終エタノール濃度20%)した後、4℃で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。沈殿物を遠心分離で分離除去し、上清を減圧乾燥後、水1リットルに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍結乾燥して本発明の抗血小板凝集組成物Bを29g得た。

[0288] 同様にして、エタノールの終濃度を40%、60%、80%にして、本発明の抗血小板凝集組成物C、D、Eを、それぞれ、27g、26g、25g得た。

[0289] 試験例A''-2 抗血小板活性の確認

実施例A''-2で得られた抗血小板凝集組成物B-Eについて、5.0mg/mLの試料濃度で、試験例A''-1と同様にして抗血小板活性を測定した。

[0290] また、実施例A''-2における、80%エタノールでの沈殿画分についても同様にして試料を調製し、抗血小板活性を測定した。その結果を表5に示す。

[0291] [表5]

試料	抗血小板活性 (%)
抗血小板凝集組成物B (20%エタノール可溶画分)	52.4
抗血小板凝集組成物C (40%エタノール可溶画分)	29.3
抗血小板凝集組成物D (60%エタノール可溶画分)	42.7
抗血小板凝集組成物E (80%エタノール可溶画分)	39.0
80%エタノール沈殿画分	1.2

[0292] 上記表5の結果により、抗血小板活性画分はエタノール可溶性画分に含まれ、20%エタノールで沈殿を除去した画分が最も活性が高いことがわかった。

[0293] 実施例A'''-1 血小板凝集抑制組成物の調製1

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80gに、蒸留水2Lを加え、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2Lを加え、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集抑制組成物A35.0gを得た。収率は43.8%であった。

[0294] 試験例A'''-1 抗血小板凝集活性の確認1

本発明の血小板凝集抑制組成物の抗血小板凝集活性を以下のようにして求めた。全血血小板凝集能測定装置(WBA-Neo:アイエスケー社製)を使用して、健常人の血液200 $\mu$ Lに、試料5 $\mu$ Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質として最終濃度が10 $\mu$ Mになるように調整した硫酸リストセチン(アメリカン バイオケミカル :100mg/バイアル)22 $\mu$ Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0295] 別途、対照として水(試料濃度0mg/mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板凝集活性(%)を計算した。

$$\text{抗血小板凝集活性(\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0296] 試料は、血小板凝集抑制組成物Aを蒸留水で希釈して1.25、2.5、5.0mg/mLと調製したもので、血小板凝集抑制組成物Aの濃度と各濃度での抗血小板凝集活性(%)を測定した結果を表6に示す。

[0297] [表6]

試料濃度	血小板凝集抑制組成物 A
0mg/mL	0
1.25mg/mL	26.2
2.5mg/mL	45.1
5.0mg/mL	92.7

[0298] 上記表6の結果により、血小板凝集において本発明の血小板凝集抑制組成物は、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を抑制することに抗血小板凝集効果が示唆された。また、血小板凝集抑制組成物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板凝集活性も増加することが確認できた。

[0299] 実施例A'''-2 血小板凝集抑制組成物の調製2

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80gに、蒸留水2Lを加え、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2Lを加え、同条件でもう1回繰り返して抽出し、それぞれの抽出液をあわせて、減圧濃縮し、200mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、1Lになるように調製(最終エチルアルコール濃度80%)した後、4℃で24時間静置後、不溶性成分を沈殿させた。沈澱物を遠心分離で分離除去し、上清を減圧濃縮後、水1Lに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍結乾燥して本発明の血小板凝集抑制組成物B12.5g(収率15.6%)を得た。

[0300] 同様にして、エチルアルコールの終濃度が20%、40%、60%にして、本発明の血小板凝集抑制組成物C13.6g(収率17.0%)、D20.8g(収率26.0%)、E21.2g(収率26.5%)を得た。

## [0301] 実施例A'''-3 血小板凝集抑制組成物の調製3

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80gに、蒸留水2Lを加え、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2Lを加え、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、凍結乾燥し、乾燥物約37.0gを得た。その乾燥物35gにエチルアルコール1Lを加え、4℃で24時間静置後、不溶性成分を沈殿させた。沈澱物を遠心分離で分離除去し、上清を減圧濃縮後、水1Lに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍結乾燥して本発明の血小板凝集抑制組成物F3.5gを得た。

## [0302] 実施例A'''-4 血小板凝集抑制組成物の調製3

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80gに、蒸留水2Lを加え、55℃で3時間抽出した。その後、遠心分離し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その残渣に蒸留水2Lを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせて、減圧濃縮し、200mLとした。この濃縮液に酢酸エチルを加え、500mLになるように調製(最終酢酸エチル濃度60%)し、よく攪拌後、4℃で24時間静置した後、酢酸エチル層を分離し、減圧濃縮後、濾液を凍結乾燥して本発明の血小板凝集抑制組成物G12.5gを得た。

## [0303] 実施例A'''-5 血小板凝集抑制組成物の調製4

アムラー乾燥果実を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水2Lを加え、さらにペクチナーゼ0.1g及びタンナーゼ0.1gを加えて、55℃で2時間抽出した。その後、90℃で30分間酵素失活させた。その後、遠心分離(3000rpm、10分間)し、その上清を濾過し、濾液をスプレードライし、本発明の血小板凝集抑制組成物H45gを得た。

## [0304] 試験例A'''-2 抗血小板凝集活性の確認2

実施例A'''-2で得られた血小板凝集抑制組成物B、C、D、E、実施例A'''-3で得られた血小板凝集抑制組成物F、実施例A'''-4で得られた血小板凝集抑制組成物G及び実施例A'''-5で得られた血小板凝集抑制組成物Hについて、5.0mg/mLの濃度で試験例A'''-1と同じ方法で血小板凝集率を測定し、抗血小板

凝集活性を算出した。その結果を表7に示す。

[0305] [表7]

血小板凝集抑制組成物	抗血小板凝集活性 (%)
A (水抽出のみ)	92.7
B (エチルアルコール 80%)	94.6
C (エチルアルコール 20%)	95.5
D (エチルアルコール 40%)	97.1
E (エチルアルコール 60%)	93.7
F (エチルアルコール 100%)	96.3
G (酢酸エチル 60%)	94.6
H (酵素処理)	93.7

[0306] 表7に示すようにどの血小板凝集抑制組成物も高い抗血小板凝集活性を示した。

[0307] 実施例A'''-6 血小板凝集抑制組成物含有食品(錠菓)の調製

実施例A'''-1で得られた血小板凝集抑制組成物A5g、乳糖30g、DHA含有粉末油脂(サンコートDY-5;太陽化学株式会社製)12g、ショ糖脂肪酸エステル4g、ヨーグルト香料4gを混合し、この混合物をロータリー式打錠機を用いて加圧成形して1錠が300mgの本発明の血小板凝集抑制組成物含有飲食品(錠菓)を得た。

[0308] 実施例A'''-7 血小板凝集抑制組成物含有飲料の調製

実施例A'''-2で得られた血小板凝集抑制組成物B5g及び、1/5濃縮グレープフルーツ透明果汁2.1g、エリスリトール30g、クエン酸結晶2.5g、クエン酸三ナトリウム0.5g、L-アスコルビン酸0.5g、乳酸カルシウム1.93g、CCP0.15g、グレープフルーツ香料1.0を水に混合溶解して、全量を1000mLとし、それを100mLの瓶に充填し、キャップで密栓した後、90℃、30分間加熱殺菌をして、本発明の血小板凝集抑制組成物含有飲食品を得た。

[0309] 実施例A'''-8 血小板凝集抑制組成物含有飲料(野菜果汁混合飲料)の調製

実施例A'''-2で得られた血小板凝集抑制組成物C0.2g及び、グアーガム分解

物(サンファイバーR;太陽化学株式会社製)3gを市販の野菜果汁混合飲料100mLに添加混合溶解して、本発明の血小板凝集抑制組成物含有飲食品(野菜果汁混合飲料)を得た。

[0310] 実施例A'''-9 血小板凝集抑制組成物含有クッキーの調製

実施例A'''-2で得られた血小板凝集抑制組成物D4g及び、市販のケーキミックス粉200gを容器に入れた後、バター35gを入れ、木杓子で混ぜ合わせた。それに溶き卵25gを加えて、なめらかな生地になるまで良く練った。小麦粉を振った台の上に生地を取り出し、さらに小麦粉を振って麺棒で5mmの厚さに伸ばし、丸型で抜き、それを170℃のオーブンで10分間焼いて、1個約5gの本発明の血小板凝集抑制組成物含有クッキーを得た。

[0311] 実施例A'''-10 血小板凝集抑制組成物含有ヨーグルトの調製

実施例A'''-5で得られた血小板凝集抑制組成物H1g、市販の脱脂乳(明治乳業社製。蛋白質含量34%)95g、及び市販の無塩バター(雪印乳業社製)35gを温水0.8Lに溶解し、均質化し、全量を1Lに調整した。次いで、90℃で15分間加熱殺菌し、冷却し、市販の乳酸菌スターター(ハンゼン社製)3g(ストレプトコッカス・サーモフィラス2g及びラクトバシラス・ブルガリクス1g)を接種し、均一に混合し、100mLの容器に分注、充填し、密封し、37℃で20時間発酵させた後、冷却し、本発明の血小板凝集抑制組成物含有ヨーグルトを得た。

[0312] 実施例A'''-11 血小板凝集抑制組成物含有経口流動食の調製

カゼインナトリウム(DMV社製)50g、卵白酵素分解物(太陽化学社製)42.5g、デキストリン(松谷化学社製)100g水1Lに溶解し、水相をタンク内に調製した。これとは別に、MCT(花王社製)45g、パーム油(不二製油社製)17.5g、サフラワー油(太陽油脂社製)35g、レシチン(太陽化学社製)0.7g、消泡剤(太陽化学社製)1gを混合溶解し、油相を調製した。タンク内の水相に油相を添加し、攪拌して混合した後、70℃に加温し、更に、ホモゲナイザーにより14.7MPaの圧力で均質化した。次いで、90℃で10分間殺菌した後、濃縮し、噴霧乾燥して、中間製品粉末約260gを調製した。この中間製品粉末200gに実施例A'''-2で得られた血小板凝集抑制組成物C4g、デキストリン(松谷化学社製)156g、グアーガム分解物(サンファイバーR;太陽



化学株式会社製) 18g、少量のビタミンとミネラルおよび粉末香料を添加し、均一に混合して、血小板凝集抑制組成物を含有する経口流動食約380gを得た。

[0313] 実施例A'''-12 血小板凝集抑制組成物含有錠剤の調製

実施例A'''-3で得られた血小板凝集抑制組成物F10g、結晶セルロース5g、トウモロコシデンプン13.8g、乳糖32.5g、ヒドロキシプロピルセルロース3.3gを混合し、顆粒化した。この顆粒化物にステアリン酸マグネシウム1.0gを加え、均一に混合し、この混合物をロータリー式打錠機を用いて加圧成形して一錠が130mgの本発明の血小板凝集抑制組成物含有錠剤を得た。

[0314] なお、実施例A'''-6〜12において使用した血小板凝集抑制組成物を、以下の実施例で示す、本発明の抗血栓組成物、フィブリン形成阻害組成物、抗血小板凝集組成物、血栓予防組成物、血栓予防用組成物、外因系凝固予防組成物、抗血液凝固組成物、血小板凝集予防組成物、血小板凝集予防用組成物、抗血栓用組成物、抗血小板凝集用組成物、血小板凝集血栓抑制組成物、血小板凝集血栓抑制用組成物、抗血栓剤、又は血栓形成抑制剤に置き換えて、同様の組成物を製造した。

[0315] [茶]

実施例B-1 抗血栓用組成物の調製1

緑茶葉を1kgに対して熱水15kgを加え、90℃で30分間抽出し、茶殻を除くためにろ過した後、そのろ過液12kgに酢酸エチル12kgを加えて振とうし、静置、分配した。その水画分を分取、減圧下(0.067mpa)で脱溶媒の後、噴霧乾燥し、本発明の抗血栓用組成物Aを110g得た。

このもののポリフェノール含量は9.2%、カフェイン含量は0.7%であった。

[0316] 試験例B-1 抗血栓効果の確認

本発明の抗血栓用組成物の抗凝固活性を、人間の血液から分離した乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma, PPP)を利用して凝固計(Coagulometer; シスメックス社製)で測定した。

[0317] 反応キュベットに、試料10マイクロリットル、APTT試薬(国際試薬社製)25マイクロリットル、10%セファリン25マイクロリットルを入れて、37℃で3分間反応させた後、PPP50マイクロリットルを入れて、2分間反応させた。最後に、25ミリモル塩化カルシウ

ム50マイクロリットルを入れて、凝固させて、血漿が凝固されるまでの時間(秒)を測定し、APTTとした。

[0318] この時、対照に水を入れ、同じ方法でAPTTを測定した。測定された試料のAPTTから、下記の数式によって、対照に対する抗凝固活性(%)を計算した。

$$\text{抗凝固活性(\%)} = ((\text{試料のAPTT} - \text{対照のAPTT}) / \text{対照のAPTT}) \times 100$$

[0319] 本発明の抗血栓用組成物の濃度と、抗凝固活性との関係を確認するために、固形分濃度として、0(対照)、1、3、5mg/mLの本発明の抗血栓用組成物を使用して、その活性を測定した。その結果を、下記表8に示す。

[0320] [表8]

濃度	APTT (秒)	抗凝固活性 (%)
0mg/mL	45	0
1mg/mL	47	4.4
3mg/mL	51	13.3
5mg/mL	56	40.0

[0321] 上記表8の結果により、本発明の抗血栓用組成物が高い抗凝固活性を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例的に抗凝固活性も増加することが確認できた。

[0322] 実施例B-2 抗血栓用組成物の調製2

実施例B-1で得られた抗血栓用組成物A100グラムに、水2リットルを加えて溶解し、エタノールを加え、2.2リットルになるように調製(最終エタノール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。沈殿物を、遠心分離で分離し、減圧乾燥後、水2リットルに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍

結乾燥して本発明の抗血栓用組成物Bを25g(収率25%)を得た。

[0323] 同様にして、エタノールの終濃度が40%、60%、80%にして、本発明の抗血栓用組成物C, D, Eを得た。

[0324] ここで得られた抗血栓用組成物B-Eのポリフェノール含量はそれぞれ、B:1.1%、C:1.5%、D:1.8%、E:2.3%であり、カフェイン含量はそれぞれ、B:0.1%、C:0.3%、D:0.4%、E:0.5%であった。

[0325] 試験例B-2 抗血栓効果の確認

実施例B-2で得られた抗血栓用組成物B-Eについて、5mg/mLの濃度で、試験例B-1と同様にしてAPTTを測定した。その結果を表9に示す。

[0326] [表9]

エタノール濃度	APTT (秒)	抗凝固活性 (%)
20%	96	113
40%	104	131
60%	85	89
80%	84	87

[0327] 上記表9の結果により、エタノール濃度が40%の時に最も抗血栓効果が高いことがわかった。

[0328] 実施例B'-1 抗血小板凝集用組成物の調製1

緑茶葉1kgに対して熱水15kgを加え、90℃で30分間抽出し、茶殻を除くためにろ過した後、そのろ過液12kgに酢酸エチル12kgを加えて振とうし、静置、分配した。その水面分を分取、減圧下(0.067mpa)で脱溶媒の後、噴霧乾燥し、本発明の抗血小板凝集用組成物Aを110g得た。

このもののポリフェノール含量は9.2%、カフェイン含量は0.7%であった。

[0329] 試験例B'-1 抗血小板活性の確認

本発明の抗血小板凝集用組成物の抗血小板活性を以下のようにして求めた。血小板凝集測定機(Aggregometer;アイエスケー社製)を使用して、健常人の血小板の浮遊液(platelet rich plasma)400 $\mu$ Lに、試料80 $\mu$ Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質としてADP(1mg/mL溶液)20 $\mu$ Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0330] 別途、対照として水(試料濃度0mg/mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板活性(%)を計算した。

$$\text{抗血小板活性(\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0331] 試料濃度として、2.5、5.0、7.5mg/mLで測定した結果を、表10に示す。

[0332] [表10]

試料濃度	抗血小板活性 (%)
2.5mg/mL	13.4
5.0mg/mL	18.3
7.5mg/mL	32.9

[0333] 上記表10の結果により、本発明の抗血小板凝集組成物が高い抗血小板活性を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板活性も増加することが確認できた。

[0334] 実施例B'－2 抗血小板凝集用組成物の調製2

実施例B'－1で得られた抗血小板凝集用組成物A10グラムに、水200ミリリットルを加えて溶解し、エタノールを加え、1リットルになるように調製（最終エタノール濃度80％）した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。

[0335] 沈殿物と上澄みを遠心分離で分離し、沈殿物を減圧乾燥後、水200ミリリットルに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍結乾燥して本発明の80％エタノール不溶性画分である抗血小板凝集用組成物Bを2.7g得た。

[0336] 同様に上澄みを処理し、80％エタノール可溶性画分である抗血小板凝集用組成物Cを7.3g得た。

[0337] ここで得られた抗血小板凝集用組成物B及びCのポリフェノール含量はそれぞれ、B:3.8％、C:9.9％であり、カフェイン含量はそれぞれ、B:0.5％、C:0.8％であった。

[0338] 試験例B'－2 抗血小板活性の確認

実施例B'－2で得られた抗血小板凝集用組成物B及びCについて、5.0mg/mLの試料濃度で、試験例B'－1と同様にして抗血小板活性を測定した。その結果を表11に示す。

[0339] [表11]

試料	抗血小板活性（％）
抗血小板凝集用組成物B （エタノール沈殿画分）	42.7
抗血小板凝集用組成物C （エタノール可溶画分）	29.7

[0340] 上記表11の結果により、抗血小板活性は80％エタノールによる沈殿画分の方が高いことがわかった。

## [0341] [ハイビスカス]

## 実施例C-1 抗血液凝固組成物の調製1

ハイビスカスの乾燥した萼及び花弁を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の抗血液凝固組成物A29.8g(収率19.9%)を得た。

## [0342] 実施例C-2 抗血液凝固組成物の調製2

ハイビスカスの乾燥した葉を20メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水2Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の抗血液凝固組成物B13.4g(収率13.4%)を得た。

## [0343] 試験例C-1 ヘパリン様活性

反応キュベットに、0.05、0.1、0.2及び0.4U/mLに調整したヘパリン10 $\mu$ Lと人間の血液から分離した乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma:PPP)40 $\mu$ Lを加え、37℃で1分間反応させた。その後APTT試薬(国際試薬社製)50 $\mu$ Lを加えて、さらに37℃で2分間反応させた後、25mM塩化カルシウム50 $\mu$ Lを加えて、血漿が凝固されるまでの時間(APTT;秒)を血液凝固測定計(Coagulometer;シスメックス社製)で測定し、本発明の抗血液凝固組成物の抗血液凝固効果を評価する為にこのヘパリンの濃度とヘパリンのAPTTと関係からヘパリン様活性値(U/mg)の計算式を求めた。その結果を、下記表12に示す。

## [0344] [表12]

ヘパリン濃度 (U/mL)	APTT (秒)
0.05	39.6
0.1	50.9
0.2	86.4
0.4	180.2

[0345] 表12の結果により、ヘパリン様活性値を求める関係式は下記の通りであった。

$$\begin{aligned}
 & \text{ヘパリン様活性値 (U/mg)} \\
 &= (0.2301 \times \text{Log (試料のAPTT)} - 0.8053) \\
 & \quad / \text{試料濃度 (mg/mL)}
 \end{aligned}$$

[0346] 試験例C-2 抗血液凝固効果の確認1

反応キュベットに、実施例C-1で得られた抗血液凝固組成物A及び実施例C-2で得られた抗血液凝固組成物Bをそれぞれ固形分濃度として、0、0.1、0.3、0.5、1.0mg/mLと調整した試料10 $\mu$ LとPPP40 $\mu$ Lを加え、37°Cで1分間反応させた。その後APTT試薬(国際試薬社製)50 $\mu$ Lを加えて、さらに37°Cで2分間反応させた後、25mM塩化カルシウム50 $\mu$ Lを加えて、試験例C-1と同様にしてAPTTを測定し、試験例C-1で求めたヘパリン様活性値の関係式より、ヘパリン様活性値を求めた。その結果を表13に示す。

[0347] [表13]

項目	抗血液凝固組成物 A		抗血液凝固組成物 B	
試料濃度 (mg/mL)	APTT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)	APTT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)
0	28.0	0		
0.1	36.3	0.21	34.5	0.09
0.3	45.1	0.24	36.8	0.10
0.5	53.4	0.22	41.1	0.08
1.0	89.7	0.23	48.3	0.09
平均値±標準偏差		0.22±0.01		0.10±0.01

[0348] 表13の結果より、本発明の抗血液凝固組成物A及びBは、抗血液凝固組成物の濃度を増加と共にAPTTは増加し、抗血液凝固剤として使用されているヘパリンに換算したヘパリン様活性値はそれぞれ平均0.22U/mg及び0.10U/mgを示し、特には果実部分に高い抗血液凝固効果を示すことが確認できた。

[0349] 実施例C-3 抗血液凝固組成物の調製3

ハイビスカスの乾燥した萼及び花弁を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、500mLになるように調製(最終エチルアルコール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈殿物を分離し、上清を減圧濃縮後、蒸留水1Lを加え再溶解した。そして濾過して不溶性成分除去し、濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の血小板凝集予防組成物C12.4g(収率8.3%)を得た。また、同様にして得た濃縮液にエチルアルコールを加え、最終エチルアルコール濃度を60%、80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をしてそれぞれ本発明の血小板凝集予防組成物D9.8g(収率6.5%)、E6.7g(収率4.5%)を得た。

[0350] 試験例C-3 抗血液凝固効果の確認2

実施例C-3で得られた抗血液凝固組成物C、D及びEについて、0.5mg/mLの濃度で試験例C-1と同様にしてAPTTを測定した。その結果、APTTはそれぞれ、



55.6秒、63.7秒及び65.1秒であり、ヘパリン様活性値は、0.24U/mg、0.30U/mg及び、0.31U/mgとエチルアルコール分画することによって、より高い抗血液凝固効果を示すことが確認できた。

[0351] 尚、実施例C-3において最終エチルアルコール濃度20%での沈殿成分についても同様にしてAPTTを測定した結果、APTTは、38.1秒であり、ヘパリン様活性値は、0.06U/mgであり、抗血液凝固画分はエチルアルコール可溶画分に含まれることがわかった。

[0352] 実施例C'-1 血小板凝集予防組成物の調製1

ハイビスカスの乾燥した萼及び花弁を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集予防組成物A29.8g(収率19.9%)を得た。

[0353] 実施例C'-2 血小板凝集予防組成物の調製2

ハイビスカスの乾燥した葉を20メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水2Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集予防組成物B13.4g(収率13.4%)を得た。

[0354] 試験例C'-1 抗血小板凝集活性の確認1

本発明の抗血小板凝集組成物の抗血小板凝集活性を以下のようにして求めた。全血血小板凝集能測定装置(WBA-Neo:アイエスケー社製)を使用して、健常人の血液200 $\mu$ Lに、試料5 $\mu$ Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質として最終濃度が10 $\mu$ Mになるように調整したADP(シグマ社製:100mg/バイアル)22 $\mu$ Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0355] 別途、対照として水(試料濃度0mg/mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板凝集活性(%)を計算した。

抗血小板凝集活性(%) = ((対照の血小板凝集率 - 試料添加時の血小板凝集率)

／対照の血小板凝集率) × 100

[0356] 試料は、血小板凝集予防組成物を蒸留水で希釈して1. 25、2. 5、5. 0mg／mLと調製したもので測定した結果を、表14に示す。

[0357] [表14]

試料濃度	血小板凝集予防組成物 A	血小板凝集予防組成物 B
0mg/mL	0	0
1.25mg/mL	18.4	17.7
2.5mg/mL	43.9	40.3
5.0mg/mL	70.4	67.5

[0358] 上記表14の結果により、血小板凝集において本発明の抗血小板凝集組成物は、ADPに関連したGpIIb-IIIaによりフィブリノーゲンを介して他の血小板と結合段階を抑制することによる抗血小板凝集効果が示唆された。また抗血小板凝集組成物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板凝集活性も増加することが確認できた。

[0359] 実施例C'-3 血小板凝集予防組成物の調製3

ハイビスカスの乾燥した萼及び花弁を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、500mLになるように調製(最終エチルアルコール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈殿物を分離し、上清を減圧濃縮後、蒸留水1Lを加え再溶解した。そして濾過して不溶性成分除去し、濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の血小板凝集予防組成物C12. 4g(収率8. 3%)を得た。また、同様にして得た濃縮液にエチルアルコールを加え、最終エチルアルコール濃度を60%、80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をしてそれぞれ本発明の血

小板凝集予防組成物D9.8g(収率6.5%)、E6.7g(収率4.5%)を得た。

[0360] 試験例C'-2 抗血小板凝集活性の確認2

実施例C'-3で得られた血小板凝集予防組成物C、D及びEについて、5.0mg/mLの濃度で試験例C'-1と同じ方法で血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した。その結果、抗血小板凝集活性(%)はそれぞれ、79.2、81.4及び83.6とエチルアルコール分画することによって、より高い抗血小板凝集効果を示すことが確認できた。

[0361] 尚、実施例C'-3において最終エチルアルコール濃度20%での沈殿成分についても同様にして血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した結果、抗血小板凝集活性(%)は、11.9であり、抗血小板凝集はエチルアルコール可溶画分に含まれることがわかった。

[0362] 実施例C''-1 血小板凝集予防用組成物の調製1

ハイビスカスの乾燥した萼及び花弁を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集予防用組成物A29.8g(収率は19.9%)を得た。

[0363] 実施例C''-2 血小板凝集予防用組成物の調製2

ハイビスカスの乾燥した葉を20メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水2Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集予防用組成物B13.4g(収率13.4%)を得た。

[0364] 試験例C''-1 抗血小板凝集活性の確認1

本発明の抗血小板凝集組成物の抗血小板凝集活性を以下のようにして求めた。全血血小板凝集能測定装置(WBA-Neo:アイエスケー社製)を使用して、健常人の血液200 $\mu$ Lに、試料5 $\mu$ Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質として最終濃度が10 $\mu$ Mになるように調整した硫酸リストセチン(アメリカン バイオケミカル :100mg/バイアル))22 $\mu$ Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0365] 別途、対照として水(試料濃度0mg/mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板凝集活性(%)を計算した。

$$\text{抗血小板凝集活性(\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0366] 試料は、血小板凝集予防用組成物を蒸留水で希釈して1.25、2.5、5.0mg/mLと調製したもので測定した結果を、表15に示す。

[0367] [表15]

試料濃度	血小板凝集予防用組成物 A	血小板凝集予防用組成物 B
0mg/mL	0	0
1.25mg/mL	19.4	18.7
2.5mg/mL	43.9	45.3
5.0mg/mL	87.3	85.6

[0368] 上記表15の結果により、血小板凝集において本発明の抗血小板凝集組成物は、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を抑制することに抗血小板凝集効果が示唆された。また抗血小板凝集組成物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板凝集活性も増加することが確認できた。

[0369] 実施例C''-3 血小板凝集予防用組成物の調製3

ハイビスカスの乾燥した萼及び花卉を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、500mLになるように調製(最終エチルアルコール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈澱物を分離し、上清を減圧濃縮後、蒸留水1Lを加え再溶解した。そして濾過して不溶性成分除去し、濾液を減圧濃縮後、凍結

乾燥して本発明の血小板凝集予防組成物C12. 4g(収率8. 3%)を得た。また、同様にして得た濃縮液にエチルアルコールを加え、最終エチルアルコール濃度を60%、80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をしてそれぞれ本発明の血小板凝集予防組成物D9. 8g(収率6. 5%)、E6. 7g(収率4. 5%)を得た。

[0370] 試験例C''-2 抗血小板凝集活性の確認2

実施例C''-3で得られた血小板凝集予防用組成物C、D及びEについて、5. 0mg/mLの濃度で試験例C''-1と同じ方法で血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した。その結果、抗血小板凝集活性(%)はそれぞれ、91. 2、93. 4及び94. 6とエチルアルコール分画することによって、より高い抗血小板凝集効果を示すことが確認できた。

[0371] 尚、実施例C''-3において最終エチルアルコール濃度20%での沈殿成分についても同様にして血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した結果、抗血小板凝集活性(%)は、13. 7であり、抗血小板凝集はエチルアルコール可溶画分に含まれることがわかった。

[0372] [オナモミ]

実施例D-1 血小板凝集血栓抑制組成物の調製1

オナモミの乾燥した萼及び花卉を40メッシュ以下に粉砕し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集血栓抑制組成物A26. 4g(収率17. 6%)を得た。

[0373] 実施例D-2 血小板凝集血栓抑制組成物の調製2

オナモミの乾燥した種子を20メッシュ以下に粉砕し、その粉末100gに、蒸留水2Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集血栓抑制組成物B14. 1g(収率14. 1%)を得た。

[0374] 試験例D-1 抗血小板凝集活性の確認1

本発明の抗血小板凝集組成物の抗血小板凝集活性を以下のようにして求めた。全

血血小板凝集能測定装置(WBA-Neo:アイエスケー社製)を使用して、健常人の血液200  $\mu$  Lに、試料5  $\mu$  Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質として最終濃度が10  $\mu$  Mになるように調整したADP(シグマ社製:100mg/バイアル)22  $\mu$  Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0375] 別途、対照として水(試料濃度0mg/mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板凝集活性(%)を計算した。

$$\text{抗血小板凝集活性(\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0376] 試料は、血小板凝集血栓抑制組成物を蒸留水で希釈して1.25、2.5、5.0mg/mLと調製したもので測定した結果を、表16に示す。

[0377] [表16]

試料濃度	血小板凝集血栓抑制組成物 A	血小板凝集血栓抑制組成物 B
0mg/mL	0	0
1.25mg/mL	12.9	17.3
2.5mg/mL	33.5	37.6
5.0mg/mL	62.7	64.1

[0378] 上記表16の結果により、血小板凝集において本発明の血小板凝集血栓抑制組成物は、ADPに関連したGpIIb-IIIaによりフィブリノーゲンを介して他の血小板と結合段階を抑制することによる抗血小板凝集効果が示唆された。また血小板凝集血栓抑制組成物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板凝集活性も増加することが確認できた。

[0379] 実施例D-3 血小板凝集血栓抑制組成物の調製3

オナモミの乾燥した萼及び花卉を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100°Cで3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)

し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、500mLになるように調製（最終エチルアルコール濃度20%）した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離（8500rpm、10分間）で沈殿物を分離し、上清を減圧濃縮後、蒸留水1Lを加え再溶解した。そして濾過して不溶性成分除去し、濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の血小板凝集血栓抑制組成物C11.4g（収率は7.6%）を得た。また、同様にして得た濃縮液にエチルアルコールを加え、最終エチルアルコール濃度を60%、80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をしてそれぞれ本発明の血小板凝集予防組成物D8.7g（収率5.8%）、E5.9g（収率3.9%）を得た。

[0380] 試験例D-2 抗血小板凝集活性の確認2

実施例D-3で得られた血小板凝集血栓抑制組成物C、D及びEについて、5.0mg/mLの濃度で試験例D-1と同じ方法で血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した。その結果、抗血小板凝集活性はそれぞれ、72.2(%)、74.6(%)及び76.4%とエチルアルコール分画することによって、より高い抗血小板凝集効果を示すことが確認できた。

[0381] 尚、実施例D-3において最終エチルアルコール濃度20%での沈殿成分についても同様にして血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した結果、抗血小板凝集活性は、10.4(%)であり、抗血小板凝集画分はエチルアルコール可溶画分に含まれることがわかった。

[0382] 実施例D'-1 血小板凝集血栓抑制用組成物の調製1

オナモミの乾燥した萼及び花弁を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離（8500rpm、10分間）し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集血栓抑制用組成物A26.4g（収率17.6%）を得た。

[0383] 実施例D'-2 血小板凝集血栓抑制用組成物の調製2

オナモミの乾燥した種子を20メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水2Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離（8500rpm、10分間）し、その

上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血小板凝集血栓抑制用組成物B14. 1g(収率14. 1%)を得た。

[0384] 試験例D'-1 抗血小板凝集活性の確認1

本発明の血小板凝集血栓抑制用組成物の抗血小板凝集活性を以下のようにして求めた。全血血小板凝集能測定装置(WBA-Neo:アイエスケ-社製)を使用して、健常人の血液200  $\mu$  Lに、試料5  $\mu$  Lを添加したのち、凝集を惹起させる物質として最終濃度が10  $\mu$  Mになるように調整した硫酸リストセチン(アメリカン バイオケミカル :100mg/ $\mu$ バイアル)22  $\mu$  Lを加え、5分後の血小板凝集率を測定した。

[0385] 別途、対照として水(試料濃度0mg/ $\mu$ mL)を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板凝集活性(%)を計算した。

$$\text{抗血小板凝集活性(\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0386] 試料は、血小板凝集血栓抑制用組成物を蒸留水で希釈して1. 25、2. 5、5. 0mg/ $\mu$ mLと調製したもので測定した結果を、表17に示す。

[0387] [表17]

試料濃度	血小板凝集血栓抑制用組成物 A	血小板凝集血栓抑制用組成物 B
0mg/mL	0	0
1.25mg/mL	17.6	19.2
2.5mg/mL	41.2	44.8
5.0mg/mL	83.7	86.7

[0388] 上記表17の結果により、血小板凝集において本発明の血小板凝集血栓抑制用組成物は、vWFによるコラーゲンとGpIbの間の架橋形成を抑制することに抗血小板凝集効果が示唆された。また血小板凝集血栓抑制用組成物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板凝集活性も増加することが確認できた。



[0389] 実施例D'-3 血小板凝集血栓抑制用組成物の調製3

オナモミの乾燥した萼及び花卉を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末150gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、500mLになるように調製(最終エチルアルコール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈殿物を分離し、上清を減圧濃縮後、蒸留水1Lを加え再溶解した。そして濾過して不溶性成分除去し、濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の血小板凝集血栓抑制組成物C11.4g(収率は7.6%)を得た。また、同様にして得た濃縮液にエチルアルコールを加え、最終エチルアルコール濃度を60%、80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をしてそれぞれ本発明の血小板凝集予防組成物D8.7g(収率5.8%)、E5.9g(収率3.9%)を得た。

[0390] 試験例D'-2 抗血小板凝集活性の確認2

実施例D'-3で得られた血小板凝集血栓抑制用組成物C、D及びEについて、5.0mg/mLの濃度で試験例D'-1と同じ方法で血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した。その結果、抗血小板凝集活性(%)はそれぞれ、90.5、91.3及び93.4とエチルアルコール分画することによって、より高い抗血小板凝集効果を示すことが確認できた。

[0391] 尚、実施例D'-3において最終エチルアルコール濃度20%での沈殿成分についても同様にして血小板凝集率を測定し、抗血小板凝集活性を算出した結果、抗血小板凝集活性(%)は、9.8であり、抗血小板凝集はエチルアルコール可溶画分に含まれることがわかった。

[0392] [ギムネマ]

実施例E-1 血栓形成抑制剤の調製1

ギムネマ乾燥粉末を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを入れ、55℃で3時間抽出した。その後、濾過により、抽出液と残渣を分離した。更に、その残渣に蒸留水2リットルを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、凍結乾燥し、本発明の血栓形成抑制剤Aを28g得た。

[0393] 試験例E-1 血栓形成抑制効果の確認

本発明の血栓形成抑制剤の抗血小板活性を以下のようにして求めた。血小板凝集測定機 (Aggregometer; アイエスケー社製) を使用して、健常人の血小板の浮遊液 (platelet rich plasma) 400  $\mu$  L に、試料 80  $\mu$  L を添加したのち、凝集を惹起させる物質として ADP (1mg/mL 溶液) 20  $\mu$  L を加え、5 分後の血小板凝集率を測定した。

[0394] 別途、対照として水 (試料濃度 0mg/mL) を添加して、同じ方法で血小板凝集率を測定した。測定された血小板凝集率から、下記の数式によって、対照に対する抗血小板活性 (%) を計算した。

$$\text{抗血小板活性 (\%)} = ((\text{対照の血小板凝集率} - \text{試料添加時の血小板凝集率}) / \text{対照の血小板凝集率}) \times 100$$

[0395] 試料濃度として、2.5、5.0、7.5mg/mL で測定した結果を、表18に示す。

[0396] [表18]

試料濃度	抗血小板活性 (%)
2.5mg/mL	14.6
5.0mg/mL	18.3
7.5mg/mL	36.6

[0397] 上記表18の結果により、本発明の血栓形成抑制剤が高い抗血小板活性を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例的に抗血小板活性も増加することが確認できた。

[0398] 実施例E-2 血栓形成抑制剤の調製2

ギムネマ乾燥粉末を40メッシュ以下に粉碎し、その粉末80グラムに、蒸留水2リットルを入れ、55℃で3時間抽出した。その後、濾過により、抽出液と残渣を分離した。

更に、その残渣に蒸留水2リットルを入れ、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせて、減圧濃縮し、200ミリリットルとした。この濃縮液にエタノールを加え、1リットルになるように調製(最終エタノール濃度80%)した後、4℃で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。

[0399] 沈澱物と上澄みを遠心分離で分離し、沈澱物を減圧乾燥後、水2リットルに再溶解し、濾過して不溶性成分除去後、濾液を凍結乾燥して本発明の80%エタノール不溶性画分である血栓形成抑制剤Bを7g得た。

[0400] 同様に上澄みを処理し、80%エタノール可溶性画分である血栓形成抑制剤Cを21g得た。

[0401] 試験例E-2 血栓形成抑制効果の確認

実施例E-2で得られた血栓形成抑制剤B及びCについて、5.0mg/mLの試料濃度で、試験例E-1と同様にして抗血小板活性を測定した。その結果を表19に示す。

[0402] [表19]

試料	抗血小板活性 (%)
血栓形成抑制剤B (エタノール沈殿画分)	13.4
血栓形成抑制剤C (エタノール可溶画分)	47.6

[0403] 上記表19の結果により、抗血小板活性は80%エタノールによる可溶画分の方が高いことがわかった。

[0404] [ヒジキ]

実施例F-1 外因系凝固予防組成物の調製1

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し

、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の外因系凝固予防組成物A23.8g(収率23.8%)を得た。

[0405] 試験例F-1 抗外因系凝固活性の確認1

本発明の外因系凝固予防組成物の抗外因系凝固活性を以下のようにして求めた。血液凝固測定計(Coagulometer;シスメックス社製)を使用して、健常人の血小板の浮遊液(platelet rich plasma)40 $\mu$ Lに、標準ヘパリンを蒸留水で希釈して0、0.05、0.1、0.2及び0.3U/mLに調整したヘパリン試液の試料10 $\mu$ Lを加え、37°Cで1分間反応させた。その後PT試薬(国際試薬社製)100 $\mu$ Lを加えて、血漿が凝固されるまでの時間を測定し、PTを測定した。このヘパリン試液の濃度とPTと関係から下記のヘパリン様活性値(U/mg)の数式を求めた。

ヘパリン様活性値(U/mg)

$$= (2.0438 \times \text{Log}(\text{試料のPT}) - 4.8867) / \text{試料濃度}(\text{mg/mL})$$

[0406] そして、本発明の外因系凝固予防組成物Aの濃度を固形分濃度として、0.078、0.156、0.313、0.625、1.25mg/mLとしてなるように蒸留水で希釈して試料を調整し、同じ方法でPTを測定し、上記数式に当てはめて各試料濃度におけるヘパリン(1U/mL)に対するヘパリン様活性値を求めた。

[0407] また、ヘパリン試液濃度0mg/mLを対照とした各試料濃度におけるPT比を下記の数式によって計算した。

$$\text{PT比} = \text{試料添加時のPT} / \text{対照(ヘパリン試液濃度0mg/mL)のPT}$$

[0408] これらの結果を表20及び表21に示す。

[0409] [表20]

標準 $\alpha$ リン	
$\alpha$ リン濃度 (U/mL)	PT (秒)
1	18.1
0.5	13.2
0.25	12.3
0.125	11.8
0.0625	11.6
0	10.9

[0410] [表21]

外因系凝固予防組成物			
試料濃度 (mg/mL)	PT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)	PT 比
1.25	34.5	1.88	3.17
0.625	18.3	1.69	1.68
0.313	14.9	2.03	1.37
0.156	12.4	1.66	1.14
0.078	11.6	1.57	1.06

[0411] 表21の結果により、本発明の外因系凝固予防組成物Aは、抗血液凝固剤として使用されているヘパリンに換算したヘパリン様活性値は平均1.77U/mgであり、高く、また、外因系凝固予防組成物の濃度を増加と共に比例してPT及び抗外因系凝固活性も増加することが確認できた。

[0412] 実施例F-2 外因系凝固予防組成物の調製2

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末200gに、蒸留水6Lを加え、100℃で3時間抽出した。遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その後、その残渣に蒸留水6Lを加え、同条件でもう1回繰り返して抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエチルアルコールを加え、500mLになるように調製(最終エチルアルコール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈澱物を分離し、その沈澱物に蒸留水1Lを加え再溶解し、濾過して不溶性成分除去した。その濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の外因系凝

固予防組成物B32. 8g(収率16. 4%)を得た。また、同様にして得た濃縮液にエチルアルコールを加え、最終エチルアルコール濃度を60%及び80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をして本発明の外因系凝固予防組成物C28. 4g(収率14. 2%)及びD21. 2g(収率10. 6%)を得た。また、最終エチルアルコール濃度60%の上清にエチルアルコールを加えてエチルアルコールの終濃度を80%にして沈殿させ、同様の操作をして本発明の外因系凝固予防組成物E2. 8g(収率1. 4%)を得た。

[0413] 実施例F-3 外因系凝固予防組成物の調製3

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、50%エチルアルコール水3Lを加え、室温℃で3日間放置し、抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の外因系凝固予防組成物F21. 1g(収率21. 1%)を得た。

[0414] 試験例F-2 抗外因系凝固活性の確認2

実施例F-1で得られた外因系凝固予防組成物A、実施例F-2で得られた外因系凝固予防組成物B、C、D、E及び実施例F-3で得られた外因系凝固予防組成物Fについて固形分濃度として0. 2mg/mLの濃度で、PTを測定した。そして試験例F-1のヘパリン様活性値(U/mg)の計算式に当てはめて各外因系凝固予防組成物のヘパリン様活性値及びPT比を求めた。また、実施例F-2における80%エチルアルコールでの上清画分についても同様にして試料を調整し、ヘパリン様活性値及びPT比を求めた。その結果を表22に示す。

[0415] [表22]

	PT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)	PT 比
外因系凝固予防組成物A	13.3	2.01	1.22
外因系凝固予防組成物B	15.5	3.58	1.42
外因系凝固予防組成物C	16.8	4.4	1.54
外因系凝固予防組成物D	17.6	4.87	1.61
外因系凝固予防組成物E	18.8	5.55	1.72
外因系凝固予防組成物F	15.8	3.77	1.45
80%エチルアルコール上清画分	11.1	0.16	1.02

[0416] 表22より、実施例F-2において得たエチルアルコール沈殿成分について高いヘパリン様活性値を示すことが確認でき、優れた抗外因系凝固効果はエチルアルコールによる沈殿部分に含まれることがわかった。

[0417] 実施例F'-1 血栓予防組成物の調製1

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血栓予防組成物A23.8gを得た。収率は23.8%であった。

[0418] 試験例F'-1 血栓予防効果の確認

本発明の血栓予防組成物Aの血栓予防効果を人間の血液から分離した乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma, PPP)を利用して血液凝固測定計(Coagulometer)によりAPTTを測定し、評価した。

[0419] 反応キュベットに、本発明の血栓予防組成物Aの濃度を固形分濃度として、0.075、0.15、0.3、0.5mg/mLと調整した試料10μLとPPP40μLを加え、37℃で1分間反応させた。その後APTT試薬(国際試薬社製)50μLを加えて、さらに37℃で2分間反応させた後、25mM塩化カルシウム50μLを加えて、血漿が凝固されるまでの時間(秒)を測定し、APTTとした。その結果を、下記表23に示す。

[0420] この時、対照に試料として0.05、0.1、0.2及び0.3U/mLに調整したヘパリン



を用いて、同じ方法でAPTTを測定した。このヘパリンの濃度とヘパリンのAPTTと関係から下記のヘパリン様活性値(U/mg)の計算式を求め、その計算式に当てはめて各試料濃度におけるヘパリン(1U/mL)に対するヘパリン様活性値を求めた。その結果を、下記表24に示す。

ヘパリン様活性値(U/mg)

$$= (0.1648 \times \text{Log}(\text{試料のAPTT})) / \text{試料濃度}(\text{mg/mL})$$

[0421] [表23]

ヘパリン濃度 (U/mL)	APTT (秒)
0.05	39.6
0.1	50.9
0.2	86.4
0.3	180.2

[0422] [表24]

試料濃度 (mg/mL)	APTT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)
0.075	33.1	0.37
0.15	38.3	0.35
0.3	53.4	0.36
0.5	84.2	0.36
	平均値	0.36

[0423] 表24の結果により、本発明の血栓予防組成物Aは、血栓予防組成物の濃度の増加と共にAPTTは増加し、抗血液凝固剤として使用されているヘパリンに換算したヘパリン様活性値は平均0.36U/mgと高い抗血液凝固効果を示すことが確認できた。

[0424] 実施例F'-2 血栓予防組成物の調製2

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末200gに、蒸留水6Lを加え、100℃で3時間抽出した。遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その後、その残渣に蒸留水6Lを加え、同条件でもう1回繰り返し抽出し、それぞれの抽出液をあわせた後、減圧濃縮し、400mLとした。この濃縮液にエタノールを加え、500mLになるように調製(最終エタノール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈澱物を分離し、その沈澱物に蒸留水1Lを加え再溶解し、濾過して不溶性成分を除去した。その濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の血栓予防組成物B16.4gを得た。また、同様にして得た濃縮液にエタノールを加え、最終エタノール濃度を60%及び80%とした時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をして本発明の血栓予防組成物C21.4g及びD25.2gを得た。また、最終エタノール濃度60%の上清にエタノールを加えてエタノールの終濃度を80%にして沈殿させ、同様の操作をして本発明の血栓予防組成物E2.8gを得た。

[0425] 実施例F'-3 血栓予防組成物の調製3

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、50%エタノール水3Lを

加え、室温℃で3日間放置し、抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、本発明の血栓予防組成物F21. 1gを得た。収率は21. 1%であった。

[0426] 試験例F'-2 血栓予防効果の確認

実施例F'-1で得られた血栓予防組成物A、実施例F'-2で得られた血栓予防組成物B、D、E及び実施例F'-3で得られた血栓予防組成物Fについて固形分濃度として0. 2mg/mLの濃度で、試験例F'-1と同様にしてAPTTを測定した。そして試験例F'-1のヘパリン様活性値(U/mg)の計算式に当てはめて各血栓予防組成物のヘパリン様活性値を求めた。また、実施例F'-2における80%エタノールでの上清画分についても同様して試料を調整しヘパリン様活性値を求めた。その結果を表25に示す。

[0427] [表25]

	APTT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)
血栓予防組成物 A	43.2	0.36
血栓予防組成物 B	121.6	1.21
血栓予防組成物 C	189.7	1.58
血栓予防組成物 D	178.5	1.53
血栓予防組成物 E	195.8	1.60
血栓予防組成物 F	137.4	1.31
80%エタノール上清画分	30.9	0.08

[0428] 表25より、実施例F'-2において得たエタノール沈殿成分について高いヘパリン様活性値を示すことが確認でき、優れた抗血液凝固効果は水抽出物のエタノールによる沈殿部分に含まれることがわかった。

[0429] 実施例F''-1 血栓予防用組成物の調製1

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水3Lを加え、さらにプロテアーゼ0. 1gを加えて、55℃で3時間抽出した。その後、90℃で30分間酵素

失活させた。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、濾液をスプレードライし、本発明の血栓予防用組成物A29.4gを得た。収率は29.4%であった。

[0430] 試験例F''-1 血栓予防効果の確認

本発明の血栓予防用組成物Aの血栓予防効果を人間の血液から分離した乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma, PPP)を利用して血液凝固測定計(Coagulometer; シスメックス社製)によりAPTTを測定し、評価した。

[0431] 反応キュベットに、本発明の血栓予防用組成物Aの濃度を固形分濃度として、0.075、0.15、0.3、0.5mg/mLと調整した試料10 $\mu$ LとPPP40 $\mu$ Lを加え、37°Cで1分間反応させた。その後APTT試薬(国際試薬社製)50 $\mu$ Lを加えて、さらに37°Cで2分間反応させた後、25mM塩化カルシウム50 $\mu$ Lを加えて、血漿が凝固されるまでの時間(秒)を測定し、APTTとした。その結果を、下記表26に示す。

[0432] この時、対照に試料として0.05、0.1、0.2及び0.3U/mLに調整したヘパリンを用いて、同じ方法でAPTTを測定した。このヘパリンの濃度とヘパリンのAPTTと関係から下記のヘパリン様活性値(U/mg)の計算式を求め、その計算式に当てはめて各試料濃度におけるヘパリン(1U/mL)に対するヘパリン様活性値を求めた。その結果を、下記表27に示す。

ヘパリン様活性値(U/mg)

$= (0.1648 \times \text{Ln}(\text{試料のAPTT}) - 0.5487)$

$\div \text{試料濃度}(\text{mg/mL})$

[0433] [表26]

ヘパリン濃度 (U/mL)	APTT (秒)
0.05	39.6
0.1	50.9
0.2	86.4
0.3	180.2

[0434] [表27]

血栓予防用組成物 A 濃度 (mg/mL)	APTT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)
0.075	35.4	0.52
0.15	44.3	0.51
0.3	72.6	0.53
0.5	133.2	0.51
	平均値	0.52

[0435] 表27の結果により、本発明の血栓予防用組成物Aは、血栓予防用組成物の濃度を増加と共にAPTTは増加し、抗血液凝固剤として使用されているヘパリンに換算したヘパリン様活性値は平均0.52U/mgと高い抗血液凝固効果を示すことが確認できた。

[0436] 実施例F''-2 血栓予防用組成物の調製2

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水3Lを加え、さらにプロテアーゼ0.1gを加えて、55℃で3時間抽出した。その後、90℃で30分間酵素失活させた。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、濾液を減圧濃縮し、200mLとした。この濃縮液にエタノールを加え、250mLになるように調

製(最終エタノール濃度20%)した後、室温で24時間静置して、不溶性成分を沈殿させた。遠心分離(8500rpm、10分間)で沈澱物を分離し、その沈澱物に蒸留水1Lを加え再溶解し、濾過して不溶性成分除去した。その濾液を減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の血栓予防用組成物B24. 5gを得た。また、同様にして得た濃縮液にエタノールを加え、最終エタノール濃度を60%時の不溶性成分を沈殿させ、同様の操作をして本発明の血栓予防用組成物C21. 4gを得た。

[0437] 比較例F''-1 比較組成物の調製

乾燥ひじきを40メッシュ以下に粉碎し、その粉末100gに、蒸留水3Lを加え、100℃で3時間抽出した。その後、遠心分離(8500rpm、10分間)し、その上清を濾過し、抽出物と残渣を分離した。その濾液を減圧濃縮し、その後、凍結乾燥し、比較組成物23. 8gを得た。

[0438] 試験例F''-2 血栓予防効果の確認

実施例F''-1で得られた血栓予防用組成物A、実施例F''-2で得られた血栓予防用組成物B、C及び比較例F''-1で得られた比較組成物について固形分濃度として0. 2mg/mLの濃度で、試験例F''-1と同様にしてAPTTを測定した。そして試験例F''-1のヘパリン様活性値(U/mg)の計算式に当てはめて各血栓予防用組成物のヘパリン様活性値を求めた。その結果を表28に示す。

[0439] [表28]

血栓予防用組成物 A 濃度 (mg/mL)	APTT (秒)	ヘパリン様活性値 (U/mg)
0.075	35.4	0.52
0.15	44.3	0.51
0.3	72.6	0.53
0.5	133.2	0.51
	平均値	0.52

[0440] 表28より、ひじきを水抽出したものに酵素処理を加え、さらにアルコール分画処理をすることによってさらに高いヘパリン様活性値を示すことが確認できた。

[0441] [カラギナン]

#### 実施例G-1 抗血栓剤の調製1

市販の $\iota$ -カラギナン(サンカラNo. 208; 太陽化学株式会社製) 10gを、80°Cの熱水1リットルに溶解後、濾過し、減圧濃縮後、凍結乾燥して本発明の抗血栓剤Aを得た。

[0442] 同様にして、 $\kappa$ -カラギナン(サンカラNo. 1572; 太陽化学株式会社製)、 $\lambda$ -カラギナン(サンカラNo. 1057; 太陽化学株式会社製)を使用して、本発明の抗血栓剤B, Cを得た。

#### [0443] 試験例G-1 抗血栓効果の確認

本発明の抗血栓剤の抗凝固活性を、人間の血液から分離した乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma, PPP)を利用して凝固計(Coagulometer; シスメックス社製)で測定した。

[0444] 反応キュベットに、試料10マイクロリットル、APTT試薬(国際試薬社製) 25マイクロリットル、10%セファリン25マイクロリットルを入れて、37°Cで3分間反応させた後、PPP 50マイクロリットルを入れて、2分間反応させた。最後に、25ミリモル塩化カルシウム50マイクロリットルを入れて、凝固させて、血漿が凝固されるまでの時間(秒)を測定し、APTTとした。

[0445] この時、対照に水を入れ、同じ方法でAPTTを測定した。測定された試料のAPTTから、下記の数式によって、対照に対する抗凝固活性(%)を計算した。

抗凝固活性(%)

$$= ((\text{試料のAPTT} - \text{対照のAPTT}) / \text{対照のAPTT}) \times 100$$

[0446] 本発明の抗血栓剤の濃度と、抗凝固活性との関係を確認するために、固形分濃度として、0(対照)、1、3、5mg/mLの本発明の抗血栓剤を使用して、その活性を測定した。その結果を、下記表29に示す。

[0447] [表29]

試料	濃度	APTT (秒)	抗凝固活性 (%)
	0mg/mL	45	0
抗血栓組成物 A ( $\iota$ -カギン)	0.5mg/mL	162	260
	2.5mg/mL	600 以上	1200 以上
	5.0mg/mL	600 以上	1200 以上
抗血栓組成物 B ( $\kappa$ -カギン)	0.5mg/mL	99	120
	2.5mg/mL	491	991
	5.0mg/mL	600 以上	1200 以上
抗血栓組成物 C ( $\lambda$ -カギン)	0.5mg/mL	398	784
	2.5mg/mL	600 以上	1200 以上
	5.0mg/mL	600 以上	1200 以上

[0448] 上記表29の結果により、本発明の抗血栓剤が高い抗凝固活性を示すことが確認できた。また抽出物の濃度を増加させることによって比例的に抗凝固活性も増加することが確認できた。

#### 産業上の利用可能性

[0449] 本発明により、血栓形成抑制作用を有する所定の植物成分を含む血栓形成抑制用組成物が提供される。本発明の血栓形成抑制用組成物は、例えば、飲食品、医薬部外品、医薬品、飼料に応用することができる。



## 請求の範囲

- [1] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする抗血栓組成物。
- [2] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とするフィブリン形成阻害組成物。
- [3] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする抗血小板凝集組成物。
- [4] アムラーの果実、果汁及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集抑制組成物。
- [5] 茶の抽出物を含有することを特徴とする抗血栓用組成物。
- [6] 茶の抽出物を含有することを特徴とする抗血小板凝集用組成物。
- [7] ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする抗血液凝固組成物。
- [8] ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集予防組成物。
- [9] ハイビスカスの果実、果汁、葉及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集予防用組成物。
- [10] オナモミの果実、果汁、種子及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集血栓抑制組成物。
- [11] オナモミの果実、果汁、種子及びそれらの抽出物からなる群より選ばれる少なくとも1つを含有することを特徴とする血小板凝集血栓抑制用組成物。
- [12] ギムネマ、その抽出物又はそれらの混合物を含有することを特徴とする血栓形成抑制剤。
- [13] ヒジキ、その抽出物又はそれらの混合物を含有することを特徴とする外因系凝固予防組成物。
- [14] ヒジキ、その抽出物又はそれらの混合物を含有することを特徴とする血栓予防組成物。
- [15] ヒジキ、その抽出物又はそれらの混合物の酵素処理物を含有することを特徴とする

血栓予防用組成物。

- [16]      カラギナンを含有することを特徴とする抗血栓剤。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017780

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/78, A23L1/30, 2/38, 2/52, A61P7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/78, A23L1/30, 2/38, 2/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), CAPLUS (STN), JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN),  
EMBASE (STN), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6290996 B1 (Natreon Inc.), 18 September, 2001 (18.09.01), & WO 2002/23995 A1	1-4
X	Bordia A. et al., Comparative effect of vitamin C, amla juice and amla pulp on blood lipids, platelet aggregation and experimental atheroma in rabbits, Indian heart journal, 1985, Vol.37, No.3, pages 179 to 182. (Abstract) MEDLINE [on line]; STN.MEDLINE, AN.86057755, DN.PubMed ID: 4065917	1-4
X	CN 1278433 A (KUNM-M) 03 January, 2001 (03.01.01), (Family: none)	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 April, 2005 (12.04.05)

Date of mailing of the international search report  
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/017780

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

In claims 1 to 16, the inventions according to claims 1 to 4, claims 5 to 6, claims 7 to 9, claims 10 to 11, claim 12, claims 13 to 15 and claim 16 relate to antithrombotic compositions or antithrombotic agents comprising respectively amla, tea, hibiscus, *Xanthium strumarium*, gymnema, *Hijikia fusiforme* and carrageenan. It had been well known before the application of the present case that substances obtained from plants have antithrombotic effects, for example, a kiwi fruit extract shows this activity as mentioned in the description of the present case. Thus, the technical features of the inventions as claimed in the above claims reside in obtaining the above activity from a specific plant or finding the activity (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017780

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

in specific components obtained from a plant. Such being the case, the seven invention groups as described above, which are different from each other in the features, cannot be considered as having a technical feature relating to each other.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K35/78, A23L1/30, 2/38, 2/52, A61P7/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K35/78, A23L1/30, 2/38, 2/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), CAPLUS(STN), JICST ファイル(JOIS), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 6290996 B1(Natreon Inc.)2001.09.18&WO 2002/23995 A1	1-4
X	Bordia A. et al, Comparative effect of vitamin C, amla juice and amla pulp on blood lipids, platelet aggregation and experimental atheroma in rabbits, Indian heart journal, 1985, Vol. 37, No. 3, pp. 179-182. (abstract)MEDLINE[on line];STN.MEDLINE, AN. 86057755, DN. PubMed ID:4065917	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.04.2005

国際調査報告の発送日

26.04.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

8415

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	CN 1278433 A (KUNM-M) 2001. 01. 3 (ファミリーなし)	1-4

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-16の、請求項1-4にはアムラーを、請求項5-6には茶を、請求項7-9にはハイビスカスを、請求項10-11にはオナモミを、請求項12にはギムネマを、請求項13-15にはヒジキを、請求項16にはカラギナンをそれぞれ含有することを特徴とする抗血栓組成物あるいは抗血栓剤に関わる発明がそれぞれ記載されている。そして、本出願前、植物から得られたものが抗血栓作用を有することは、例えば本願明細書にも記載されているようにキウイフルーツ抽出物がそれら活性を有することが知られているように周知の事実であるから、上記請求の範囲に記載された発明の技術的特徴は、上記活性を特定の植物から得られること、あるいは植物から得られた特定の成分に見出した点にある。したがって、上記それらの特徴において異なる7つの発明群には、互いに連関する技術的特徴を有するものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-4

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。